Aus der Frauen- und Poliklinik der Freien Universität
Berlin-Charlottenburg

Direktor: Professor Dr. Med. H. Lax

RADIOIMMUNOASSAY FÜR DAS MENSCHLICHE GONADOTROPIN-RELEASING-HORMON UND SEINE ANWENDUNG UNTER VERSCHIEDENEN PHYSIOLOLGISCHEN BEDINGUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Bernd Metscher aus Berlin

1977

Aus der Frauen- und Poliklinik der Freien Universität
Berlin-Charlottenburg

Direktor: Professor Dr. Med. H. Lax

RADIOIMMUNOASSAY FÜR DAS MENSCHLICHE GONADOTROPIN-RELEASING-HORMON UND SEINE ANWENDUNG UNTER VERSCHIEDENEN PHYSIOLOLGISCHEN BEDINGUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Bernd Metscher aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. J. Nevinny-Stickel
Korreferent: Prof. Dr. F. Neumann

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 25. November 1977

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. EINLEITUNG

1. Anatomie des hypothalamisch-hypophysären Systems und seiner Umgebung 6
2. Regulation beim Menschen 7
3. Notwendigkeit der Bestimmung von Gn-RH unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen 10
4. Prinzip und Kriterien eines Radioimmunoassays 11

II. METHODIK UND UNTERSUCHUNGSGUT

1. Materialien 13
2. Jodination 14
3. Extraktion 16
4. Nachweis der Bestimmung endogenen Gn-RH's 17
5. Assayaufbau 18
6. Bestimmung anderer Hormone 19
7. Untersuchungsgut 24

III. ERGEBNISSE DES ASSAYS

1. Jodination 25
   a) LPO-Methode 25
   b) CAT-Methode 25
2. Antiseren 26
   a) Antiseren von DERMODY und JEFFCOATE 26
   b) Antiserum R-42 (NISWENDER) 26
   c) Antiserum-Verdünnung 26
   d) Bindungskapazität bei verschiedenen Inkubationszeiten 27
   e) Kreuzreaktionen 27
   f) Trennung mit verschiedenen Mengen Äthanol abs. 28

Seite

3. Extraktion 29
   a) Verwendung von Diäthyläther und Dichlormethan 29
   b) Extraktion mit Methanol 30
4. Assay 30
   a) Aufstellung von Standardkurven 30
   b) Kurvenbereich der Serumwerte 32
   c) Vergleich mit synthetischem Standard (PARLOW) 33
   d) Hook-Effekt 33
5. Zuverlässigkeitskriterien des Assays 34
   a) Bindungskontrollen 34
   b) Wiederfindung 35
   c) Extraktion verschiedener Serummengen (Poolserum) 36
   d) Intra- und Interassayvariabilität 37

IV. ANWENDUNG DES ASSAYS FÜR SERUMBESTIMMUNGEN

1. Haltbarkeit von endogenem Gn-RH im Vollblut 38
2. Bestimmung der Halbwertszeit von exogenem (endogenem?) Gn-RH 39
3. Serumspiegel bei Männern 40
4. Serumspiegel bei Frauen 41
5. Serumspiegel bei Frauen in der Postmenopause 41
6. Serumspiegel bei Kindern vor und nach der Pubertät 42
7. Untersuchungen im weiblichen Zyklus 43
8. Kurzzeitstudie über die fluktuierende Ausschüttung von Gn-RH und hypophysären Gonadotropinen 45

Seite

V. DISKUSSION

1. Halbwertszeit von Gn-RH 46
2. Serumspiegel bei Männern 47
3. Serumspiegel bei Frauen 48
4. Serumspiegel bei Frauen in der Postmenopause 48
5. Serumspiegel bei Kindern 49
6. Verhalten von Gn-RH im weiblichen Zyklus 50
7. Gn-RH während der Menstruation 50
8. Existiert eine mittzyklische Erhöhung von Gn-RH? 51
9. Gn-RH und Östrogene 52
10. Fluktuation von Gn-RH und Gonadotropinen 53
11. Existieren eigenständige Gonadotropin-Releasing-Hormone (LH-RH und FSH-RH)? 54
12. Einfluß psychischer Faktoren auf die Gn-RH - Sekretion 55

VI. ZUSAMMENFASSUNG 57

VII. LITERATURVERZEICHNIS 59

VIII. ABBILDUNGEN I - LI

I. EINLEITUNG

1. Anatomie des hypothalamisch-hypophysären Systems und seiner Umgebung

Unter dem Thalamus, der großen Ganglienmasse, die eine zentrale Stellung im Diencephalon des Menschen einnimmt, liegt der Hypothalamus, bis heute als Zentrum neurosekretorischer Aktivität bekannt (Fig. 1) (HOHLWEG und JUNKMANN).

Er umfaßt die Corpora mammillaria, das Tuber cinereum, welches sich nach ventral zum Infundibulum zuspitzt und an seiner Spitze die Hypophyse trägt, sowie als vordersten Abschnitt die Sehnervenkreuzung, das Chiasma opticum.

Die Neurone dieses Gebietes sind bestimmten Kernen zuzuordnen, von denen zahlreiche große neurosekretorische Bedeutung besitzen (Fig. 2).

Zwischen dem Hypothalamus und der Hypophyse, der wichtigsten Hormondrüse des menschlichen Organismus, bestehen sowohl neurogene Beziehungen als auch Gefäßverbindungen, aus denen im ventralen Teil des Hypothalamus, der Eminentia mediana, der hypophysäre Portalkreislauf entspringt.

Vor allem im Bereich des Tuber cinereum finden sich Kerne, die das Gonadotropin-Releasing-Hormon (Gn-RH) synthetisieren (SZENTAGOTHAI). Es handelt sich dabei insbesondere um den Nucleus Arcuatus (Fig. 2). Erst über neurosekretorische Mechanismen - Tractus tubero-infundibularis - (Fig. 4), dann über neuro-vaskuläre Synapsen, erreicht das Hormon den Portalkreislauf der Hypophyse, über den es zum Hypophysenvorderlappen (HVL) gelangt. Dort wird es an mehr oder weniger spezifischen Rezeptoren gebunden (Fig. 3).

Verschiedene Hinweise sprechen dafür, daß an den betreffenden Synapsen Noradrenalin, Dopamin und möglicherweise auch Serotonin als Transmitterstoffe fungieren.

Gn-RH konnte bereits aus Schweinehypothalami isoliert, in seiner biologischen Aktivität charakterisiert und seine Struktur aufgeklärt werden (SCHALLY 1967 und 1968, MATSUO 1971).

Es handelt sich um ein Dekapeptid der Aminosäuresequenz Glu - His - Trp - Ser - Tyr - Gly - Leu - Arg - Pro - Gly mit einem Molekulargewicht von 1201,45 (Fig. 7).

Die Einzelheiten der Ausschüttung und Weitergabe sind noch unzureichend bekannt, doch kann man heute bereits von einer sehr komplexen Regulation in diesem Gebiet sprechen, die zahlreiche Einzelfaktoren umfaßt.

Verschiedene andere Funktionen des Hypothalamus sind bekannt (Temperaturregulation, Wasserhaushalt, Hungerzentrum).

Seine hormonellen Aufgaben werden jedoch möglicherweise in Zukunft das Hauptziel der Erforschung dieses Hirnabschnittes darstellen.

2. Regulation beim Menschen

Im vorangegangenen Kapitel wurde kurz auf die Ausschüttung und den Transport des Gn-RH zur Hypophyse eingegangen. Bis heute ist nicht bekannt, ob und in welchem Maße auslösende oder regulierende Faktoren von höheren Regionen des Zentralnervensystems am Hypothalamus angreifen (HALASZ und GORSKI).

In der Hypophyse selbst erfolgt auf den Reiz der Gn-RH - Ausschüttung eine Abgabe von Luteinisierendem Hormon (LH) und Follikel-stimulierendem Hormon (FSH), den beiden wichtigsten Gonadotropinen im Verlauf des weiblichen Zyklus.

Die Theorie eines "feedback-Mechanismus" zwischen Hypothalamus und Hypophyse ist bestätigt (HOHLWEG).

Auf die Ausschüttung von LH bzw. FSH reagieren die Gonaden je nach Geschlecht mit einer erhöhten Abgabe von Testosteron oder Östrogenen und Progesteron. Aus dem Zusammenspiel der verschiedenen Hormone kommt es schließlich zur Ovulation im Zyklus der Frau.

Östrogene und Progesteron beeinflussen die Gonadotropinausschüttung der Hypophyse (NILLIUS und WIDE), wobei je nach endokrinologischer Ausgangssituation ein positiver bzw. negativer feedback-Mechanismus zwischen Gonaden und Hypophyse angenommen werden kann (CZYGAN).

Nach den vorliegenden Ergebnissen wird weiterhin ein Einfluß der Steroide am Hypothalamus angenommen. Auf diese Theorie wird in den folgenden Abschnitten noch ausführlicher eingegangen (CZYGAN, REICH, HALASZ und GORSKI).

Das FSH, Hauptstimulator für das Wachstum des Follikels, besitzt nach Ansicht verschiedener Autoren kein eigenes Releasing-Hormon (SCHALLY, ARIMURA, JEFFCOATE).

Gn-RH scheint also die LH- wie FSH-Abgabe aus der Hypophyse zu beeinflussen. Diese Behauptung muß auch nach den Ergebnissen dieser Arbeit vertreten werden.

Möglicherweise greifen Steroide in dieses System modulierend ein (YEN).

Ein derartiges Phänomen ist auch von anderen Releasing-Hormonen bekannt. So stimuliert das Thyreotropin-Releasing-

Hormon (TRH) sowohl die Sekretion von Thyreoid-Stimulating-Hormon (TSH) als auch von Prolaktin (=LTH), zwei weiteren Hypophysenhormonen.

Nach neuen Untersuchungen (LEYENDECKER) scheint auch das Progesteron, welches postovulatorisch seinen Zyklusgipfel erreicht, regulierend, vielleicht sogar auslösend in die LH- bzw. Gn-RH - Ausschüttung einzugreifen.

Zusammenfassend ist festzustellen:
Es bestehen mehrere Regulationssysteme, die teils nachgewiesen, teils vermutet werden:

a) "long feedback"	(Gonaden - Hypophyse) (NOCKE, LEYENDECKER, ODELL)
b) "short feedback"	(Hypophyse - Hypothalamus) (NAILLAR, McCANN, FRASCHINI und CORBIN)
c) "ultra-short feedback"	(Hypophyse - Hypophyse) (HIRONO et al.)
d) "ultra-long feedback"	(Gonaden - Hypothalamus) (SCHALLY)

Welche Aufgaben den einzelnen Regelkreisen zuzuordnen sind, ist heute noch großenteils hypothetisches Wissen.

Die Auswirkungen der Hormonsekretion und ihre auslösenden Faktoren sind schon relativ gut bekannt, ihre Verknüpfung jedoch noch überwiegend Gegenstand verschiedener Theorien.

3. Notwendigkeit der Bestimmung von Gn-RH unter verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen

Es ist wohl verfrüht, an dieser Stelle umfangreiche Spekulationen anzustellen über einen künftigen klinischen Wert der Gn-RH - Bestimmung, obwohl bereits Untersuchungen bei Amenorrhoe, hormonaktiven Hypophysentumoren und beim Sheehan-Syndrom durchgeführt wurden (SCHALLY, KUMASAKA, CZYGAN).

Dennoch unterliegt es keinem Zweifel, daß eine Untersuchung der Gn-RH - Sekretion unter physiologischen Bedingungen einen weiteren Schritt zum Erkennen der gesamten Hormonkonstellation des Menschen darstellt.

Ein wichtiges Anwendungsgebiet liegt möglicherweise in der Fertilitätsforschung, wo einige Autoren beispielsweise einen direkten Angriff der ovulationsauslösenden Substanz Clomiphen am Hypothalamus annehmen (CZYGAN). Gn-RH wird auch zur Ovulationsauslösung bei hypogonadotroper Ovarialinsuffizienz empfohlen (CZYGAN).

So stellt dieser Abschnitt des Gehirns, von einigen Autoren als "Sexualzentrum" bezeichnet, sicher eine aufschlußreiche Verbindung dar zwischen den noch unbekannten hormonellen, neurogenen oder auch psychischen Einflüssen der Cortex auf das hypophysär-gonadale System.

Der Wert einer Gn-RH - Bestimmung bei pathologischen Zuständen mag schwerer zu interpretieren sein. Das liegt einerseits an dem noch unbefriedigenden Wissen über die physiologischen Verhältnisse; zum anderen muß es zumindest bezweifelt werden, ob es möglich werden wird, bestimmte Erkrankungen mit Hilfe einer Gn-RH - Bestimmung zu erkennen. Dennoch wurde bereits aus negativen Gn-RH - Testergebnissen auf einen Funktionsausfall der Hypophyse geschlossen (CZYGAN).

Die im Verlauf dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse und Theorien sind nur ein kleiner Hinweis auf die hypothalamische Aktivität bei pathologischen Zuständen.

Erst die Zukunft wird mit neuen Erkenntnissen zeigen, ob und in welchem Ausmaß, nach gründlicher Erforschung der physiologischen Verhältnisse, Rückschlüsse und Nachweise einer pathologischen Situation zu ziehen sind.

4. Prinzip und Kriterien eines Radioimmunoassays

Ein Radioimmunoassay (RIA) stellt ein hochempfindliches quantitatives Nachweisverfahren für minimale Mengen einer bestimmten Substanz dar.

Dabei reagiert das zu untersuchende Material mit einem spezifischen Antikörper in Form eines reversiblen Antigen-Antikörper-Komplexes. Unter der Voraussetzung, daß Standardhormon und Hormon der unbekannten Probe sich identisch verhalten, reagieren veränderliche Mengen nicht markierten Antigens (Hormons) und eine konstante Menge markierten Antigens mit einer konstanten Menge des Antikörpers bei Antigenüberschuß.

Der Antigen-Antikörper-Komplex, der sich während der Inkubation bei 4° oder 37° C bildet, besitzt eine Radioaktivität, die abnimmt, wenn die Konzentration des nicht markierten Antigens in der Standardlösung oder der unbekannten Probe zunimmt.

Mit Hilfe einer derartig aufgestellten Standardkurve wird es möglich, unbekannte Serummengen an Hormon zu ermitteln.

Die Trennung des freien Hormons vom Antikörper-gebundenen wird dadurch erzielt, daß man zu dem AG/Ak-Komplex einen zweiten Antikörper hinzufügt (Doppel-Antikörper-Methode),

um den Komplex irreversibel zu machen, durch Adsorption des freien Antigens mittels dextranbeschichteter Aktivkohle (Adsorptionsverfahren) oder salzloser Alkoholverbindungen (Präzipitationsverfahren).

Zur Überprüfung des Assays werden Wiederfindungstests (Recovery), Verdünnungstests und Reproduzierbarkeitstests durchgeführt, um die Methode und die optimalen Bedingungen, unter denen die Reaktion abläuft, dauernd zu überprüfen bzw. zu verbessern.

Derartige Kontrolluntersuchungen erstrecken sich nicht nur auf den RIA selbst, sondern auch auf zahlreiche Reaktionen, die zur Aufstellung und Durchführung des Assays unerläßlich sind.

Auf die Einzelheiten solcher Verfahren wird in den entsprechenden Abschnitten eingegangen werden (YALOW, BERSON, SAXENA, NISWENDER 1969, JEFFCOATE 1972).

II. METHODIK UND UNTERSUCHUNGSGUT

1. Materialien

Zahlreiche verschiedene Materialien waren notwendig, um den RIA für humanes Gn-RH aufzubauen.

Sowohl als Standardlösung als auch für die radioaktive Markierung wurde hochgereinigtes synthetisches LH-RH der Firma Hoechst (Hoe 471) mit einem Reinheitsgrad von 99,1 % verwendet, das in seinem molekularen Aufbau mit biologischem Material identisch war. Ein von PARLOW entwickelter synthetischer Standard (Lot Nr. 21-103-DH) wurde mit dem eigenen verglichen (Fig. 27).

Die radioaktive Markierung erfolgte mit dem Gamma-Strahler Jod^{125} (NEN-Company).

Als Antikörper wurde ein von Kaninchen gewonnenes Gn-RH-Antiserum benutzt, das freundlicherweise von Herrn Dr. G.D. NISWENDER, Colorado State University, USA, zur Verfügung gestellt wurde (NETT und NISWENDER 1973). Antiseren von DERMODY und JEFFCOATE wurden ebenfalls im Assay getestet (DERMODY 1975, JEFFCOATE 1972).

Zahlreiche teils synthetische, teils natürliche "Fremdhormone", von verschiedenen Laboratorien zur Verfügung gestellt, dienten zur Durchführung der Kreuzreaktionen.

Beim Trennungsverfahren wurde Äthanol abs. 98 % verwandt. Zur Extraktion schließlich dienten organische Lösungsmittel wie Methanol - "Uvasol", Diäthyläther und Dichlormethan.

Neben den Jodinationspuffern, auf die im folgenden Kapitel eingegangen wird, wurde im gesamten Assay 0,1 % HSA-PBS-Puffer (pH = 7,0) verwendet.

2. Jodination

Die radioaktive Markierung des synthetischen LH-RH stellte den Autor vor große Probleme und war erst nach zahlreichen Variationen durchzuführen.

Das Hormonmolekül wurde sowohl enzymatisch mit der Lactoperoxidase-Methode (LPO-Methode) nach MIYACHI als auch mit Chloramin T (CAT-Methode) nach GREENWOOD und HUNTER jodiniert (GREENWOOD und HUNTER 1960-1962).

Insbesondere die genaue Mengenkombination an Hormon und Oxidationsmittel erwies sich als ungemein wichtig für eine ausreichende Markierung. Überhöhte Mengen an CAT, aber auch radioaktives Material von geringer spezifischer Aktivität, ließen eine Markierung nicht zu (Fig. 9). Erwähnenswert sei an dieser Stelle auch die Markierungszeit, die ebenfalls von großer Bedeutung für die Reaktion war.

Die radioaktive Markierung gelang schließlich mit folgenden Mengen:

a) Gn-RH (Hoe 471)	10 ug/10 ul aufgelöst in 0,05 m Phosphatpuffer (pH = 7,0) unter Zusatz von Merthiolat 1:10 000
b) Jod^{125}	1 mCi
c) 0,4 m Na-acetatpuffer	20 ul (pH = 5,6)
d) LPO	600 ng/40 ul
e) H_2O_2	in dreimaliger Zugabe von 1. 300 ng/20 ul 2. 150 ng/10 ul nach 10 min. 3. 150 ng/10 ul nach 5 min.
f) CH_3COOH 0,01 m	0,5 ml als Reaktionsstop nach weiteren 5 min.

Das Gemisch von insgesamt 610 ul wurde anschließend auf eine Sephadex G-25 - Säule aufgebracht, die mit 2 ml 2 %-iger BSA-CH_3COOH - Lösung gesättigt war.

Ebenso wie bei der CAT-Methode wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt, wobei die Eluierung der Säule mit 0,01 m CH_3COOH erfolgte.

Die CAT-Methode wies folgende Mengenangaben auf:

a) Gn-RH (Hoe 471)	2,5 ug/20 ul aufgelöst in 0,05 m Phosphatpuffer (pH = 7,0)
b) Jod^{125}	1 mCi
c) 0,5 m Phosphatpuffer	30 ul (pH = 7,0)
d) CAT	20 ug/10 ul
e) 16 % Glucose-Lösung	100 ul
f) Na-bisulfit	40 ug als Reaktionsstop nach 15 sec.

Die Eluierung erfolgte hierbei auf einer Sephadex G-10 - Säule, die mit 0,01 m CH_3COOH - Puffer (pH = 5,6) äquilibriert wurde. Die Aktivitäten der gesammelten Fraktionen wurden im Gamma-Zählgerät gemessen.

Mit der Trichloressigsäure-Fällung nach LOEWRY wurde die spezifische Aktivität des spaltbaren Materials bestimmt. Sie betrug bei den erfolgreichen Markierungen 150 - 300 mCi/mg. Bei diesen Aktivitäten blieb die volle Antigenität des verwendeten synthetischen LH-RH erhalten.

3. Extraktion

Auch unter Ausnutzung der größtmöglichen Sensitivität des Gn-RH-Assays war es nicht möglich, das Hormon direkt im Serum zu bestimmen. Die Proben mußten deshalb einem "Konzentrierungsverfahren" unterworfen werden, der Extraktion, um periphere Blutspiegel zu erfassen.

Das Verfahren entstand aus der Überlegung, daß hochmolekulare Proteine oder Lipide im Serum die Bestimmung von Gn-RH stören könnten. Durch Zusatz organischer Lösungsmittel, wie Diäthyläther (DÄÄ), Dichlormethan (DCM) oder Methanol, konnten diese Störfaktoren weitgehend ausgeschaltet werden.

Während DÄÄ und DCM keine befriedigenden Ergebnisse lieferten, erreichte die Extraktion mit Methanol einen ausreichenden Recoverywert (III, 5).

Nach zahlreichen Testreihen ergab sich ein günstigstes Mischungsverhältnis von 2 ml Serum und 6 ml Methanol.

Das Gemisch wurde 20 min. bei 2000 Upm zentrifugiert und der Überstand anschließend mit Stickstoff vertrieben.

Der verbliebene Trockenrückstand wurde in 0,5 ml 0,1 % HSA-PBS-Puffer aufgelöst und 2 mal 0,2 ml für die Bestimmung im Assay abgenommen.

Besondere Beachtung bei diesem Verfahren verlangte die ausreichende Durchmischung des Serum-Methanol-Gemisches und die exakte Einhaltung der Temperatur während der Vertreibung. Da es sich bei dem Hormonmolekül um ein Protein handelt, durften 45° C nicht überschritten werden, um eine mögliche Hitzedenaturierung zu vermeiden.

4. Nachweis der Bestimmung endogenen Gn-RH's

Da das Extraktionsverfahren einen relativ langwierigen und komplizierten Vorgang darstellt, tauchte die Frage auf, ob möglicherweise dabei Veränderungen am Hormonmolekül auftreten könnten, die den eigentlichen Nachweis im Assay beeinflussen konnten. Andererseits war es klar, daß trotz zahlreicher Überprüfungen, die im Verlauf dieser Arbeit aufgeführt werden, der eigentliche Nachweis für die tatsächliche Bestimmung e n d o g e n e n Gn-RH's noch immer fehlte.

Daher wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie an der Freien Universität Berlin drei Nachweisverfahren entwickelt, die nach Ansicht des Autors mögliche noch verbliebene Zweifel entkräften.

Es würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, wenn hier alle Einzelheiten der sehr umfassenden Versuche beschrieben würden (SCHMIDT-GOLLWITZER und POLLOW).

An dieser Stelle soll nur ein kleiner Einblick in die Problematik gegeben werden.

Mit Hilfe der Agarose Gel-Filtration, der DEAE-Sephadex-Chromatographie und einer isoelektrischen Fokussierung konnte klar gezeigt werden, daß sowohl methanolextrahiertes endogenes Gn-RH als auch Jod^{125}-markiertes Releasing-Hormon im gleichen Bereich eluiert werden. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels radioimmunologischer Methoden im Gamma-Zählgerät bestimmt.

5. Assayaufbau

Alle im nachfolgenden Teil aufgeführten Ergebnisse wurden als Doppel- bzw. Dreifachtests bestimmt. Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, wurde für jede Einzelbestimmung 0,2 ml Serum verwandt. Die Kombination der einzelnen Reaktionspartner erfolgte in Anlehnung an den von JEFFCOATE beschriebenen Gn-RH-Assay.

Es ergab sich demnach folgender Assayaufbau (Angaben in ml):

	Tracer	AS 1:16 000	Standard	Serum	Puffer (pH=7,0)
Totalaktivität	0,1	-	-	-	0,3
Blank	0,1	-	-	-	0,3
Bindungskapazität	0,1	0,1	-	-	0,2
Standard	0,1	0,1	0,1	-	0,1
Serumproben	0,1	0,1	-	0,2	-

Die Inkubationszeit betrug 24 h ohne Tracer, gefolgt von 8 h Inkubation nach Tracerzugabe. Anschließend wurde mit 1,5 ml Äthanol abs. getrennt (außer Totalaktivität), gut gemischt und jede Probe 20 min. bei 4° C und 3500 Upm zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und der Bodensatz, überwiegend der verbliebene AG/Ak-Komplex, im Gamma-Zähler gemessen.

Aus den ermittelten Zählraten wurde an Hand von Standardkurven die betreffende Hormonmenge im Serum bestimmt.

Auf die Einzelheiten der entsprechenden Abschnitte wird im Kapitel III eingegangen.

6. Bestimmung anderer Hormone

Die Bestimmung der anderen Hormone erfolgte nach unterschiedlichen Kriterien wie folgt:

Bestimmung von LH:

1. Methode:
   RIA mit der Doppel-Antikörper-Methode

2. Antigen:
   Hochgereinigtes hypophysäres LH (biologische Aktivität = 4 mIU) LER 960, NIH

3. Markierung:
   CAT-Methode, modifiziert nach SAXENA
   Tracer: Jod^{125} Säule: Cellulose CF 11
   Spezifische Aktivität: 100-200 mCi/mg

4. Antiserum: (Batch 1 NIH)
   Kaninchen-Anti-LH 1:12 000 und Kaninchenserum 1:300
   2. Antikörper: Anti-Rabbit-Globulin 1:20 (WELCOME)

5. Standard:
   Hochgereinigtes hypophysäres LH (LER 960)
   Umrechnung: Mitbestimmung eines 2nd-IRP-HMG

6. Kontrollseren:
   50, 100 und 200 ul fetales Kontrollserum im Standard als hormonfreies Serum

7. Puffer:
   1 % HSA-PBS-Puffer (pH = 7,0)

8. Assayansatz: (Angaben in ul)

	Puffer	1.Ak	Kan. ser.	fet. Kälb.	Stand.	Serum	Tracer	2.Ak
TA	-	-	-	-	-	-	100	-
Blank	400	-	100	200	-	-	100	-
Bin.kap.	300	200	-	100	-	-	100	100
Standard	200	200	-	100	100	-	100	100
2nd-IRP	200	200	-	100	100	-	100	100
KS 50	350	200	-	-	-	50	100	100
KS 100	300	200	-	-	-	100	100	100
KS 200	200	200	-	-	-	200	100	100
Serum	300	200	-	-	-	100	100	100

Gesamt-Assay-Volumen = 800 ul.

9. Inkubation: bei 4° C
   a) 48 h Ansatz ohne Tracer
   b) 24 h nach Tracerzugabe
   c) 24 h nach Zugabe des 2. Antikörpers

10. Trennung:
    Zugabe von 1 ml aqua bidest.
    Zentrifugation 45 min. bei 3000 Upm
    Überstand abgießen
    Bodensatz im Gamma-Zähler messen

11. Besonderheiten:
    Alle Proben als Doppel- oder Dreifachbestimmungen.

Bestimmung von FSH:

1. Methode:
   RIA mit der Doppel-Antikörper-Methode

2. Antigen:
   Hochgereinigtes hypophysäres FSH (biologische Aktivität = 2,5 mIU) LER 1575-C, NIH

3. Markierung:

CAT-Methode, modifiziert nach SAXENA

Tracer: Jod^{125} Säule: Cellulose CF 11

Spezifische Aktivität: 100-200 mCi/mg

4. Antiserum:

Kaninchen-Anti-FSH 1:4000 und Kaninchenserum 1:300

2. Antikörper: Anti-Rabbit-Globulin 1:20

5. Standard:

Hochgereinigtes hypophysäres FSH (LER 1575-C)

Umrechnung: Mitbestimmung eines 2nd-IRP-HMG

(NRC Millhill, London, England)

6. Kontrollseren:

50, 100 und 200 ul

7. Puffer:

1 % HSA-PBS-Puffer (pH = 7,0)

Kaninchen- bzw. fetales Kälberserum zur Stabilisierung

8. Assayansatz: (Angaben in ul)

	Puffer	1.Ak	Kan. ser.	fet. Kälb.	Stand.	Serum	Tracer	2.Ak
TA	-	-	-	-	-	-	100	-
Blank	500	-	100	200	-	-	100	-
Bin.kap.	300	200	-	200	-	-	100	100
Standard	200	200	-	200	100	-	100	100
2nd-IRP	200	200	-	200	100	-	100	100
KS 50	300	200	-	150	-	50	100	100
KS 100	300	200	-	100	-	100	100	100
KS 200	300	200	-	-	-	200	100	100
Serum	300	200	-	-	-	200	100	100

Gesamt-Assay-Volumen = 900 ul.

9. Inkubation: bei 4^{o} C

Wie LH

10. Trennung:
    Wie LH

11. Besonderheiten:
    Alle Proben als Doppel- oder Dreifachbestimmungen.

Bestimmung von Östradiol:

1. Methode:
   RIA nach NISWENDER et al.

2. Antigen:
   Hochgereinigtes 17,ß-Östradiol

3. Tracer:
   Tritium (H^3) - markiertes Östradiol
   Spezifische Aktivität: 100 mCi/mmol bzw. 372 mCi/mg

4. Antiserum:
   Östradiol-succinyl-BSA 1:40 000

5. Extraktion:
   200 ul Serum wurden unter Zugabe von 3 - 5 ml Diäthyläther extrahiert, in einem Trockeneis-Methanol-Gemisch (-70 - -80° C) ausgefroren und der Überstand mit Stickstoff bei 40° C vertrieben.

   Der Trockenrückstand wurde in 1 ml 0,1 % Gelatine-PBS-Puffer (= Puffer A) (pH = 7,0) gelöst und 30 - 60 min. bei 37° C im Wasserbad äquilibriert.

6. Assayansatz: (Angaben in ml)

	Puffer A	Antik.	Tracer	Stand.	Puffer B	Charcoal
TA	0,5	-	0,1	-	0,1	1,0
Supernantant (= Blank)	0,5	-	0,1	-	0,1	1,0
Serumunit (= BK)	0,4	0,1	0,1	-	0,1	1,0
Standard	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	1,0
Serum	0,4 (enthält Serumextrakt)	0,1	0,1	-	0,1	1,0
Recovery	0,3	0,1	0,1	0,1 (aufgearbeitet 0,4 v. Extrakt)	0,1	1,0
Kontrollserum	0,4	0,1	0,1	-	0,1	1,0
Blank (H_2O)	0,4	0,1	0,1	-	0,1	1,0

Gesamt-Assay-Volumen = 0,6 ml.

7. Inkubation und Trennung:

a) Assayansatz
b) Inkubation 24 h bei 4^{o} C
c) Zugabe von 0,1 ml 0,5 % Gelatine-PBS-Puffer (= Puffer B) (pH = 7,0)
d) Zugabe von 1 ml Dextran-Charcoal-Gemisch
e) Zentrifugation 20 min. bei 2000 Upm
f) Überstand in 10 ml Szintillationsflüssigkeit geben
g) Messung im Beta-Zählgerät.

Bestimmung von Progesteron:

nach HOFFMAN et al.
gleiche Anleitung wie Bestimmung von Östradiol aber Unterschiede bei:

Antigen
Antikörper 1:4000
Standard
Verwendung von 0,05 ml Serum.

Bestimmung von Testosteron:

gleiche Anleitung wie Bestimmung von Östradiol aber Unterschiede bei:

Antigen
Antikörper 1:4000
Standard
Verwendung von 0,05 ml Serum.

7. Untersuchungsgut

Das Untersuchungsgut umfaßte 86 Versuchspersonen, mit deren Hilfe die Untersuchungen durchgeführt wurden. Die Einteilung gliederte sich wie folgt:

A) Serumspiegel von Gn-RH bei Erwachsenen (einschließlich der Haltbarkeits- und Halbwertszeitbestimmung) 54 Probanden
B) Serumspiegel von Gn-RH bei Kindern 20 Probanden
C) Serumspiegel von Gn-RH im Zyklus 6 Probanden
D) Fluktuationsstudie von Gn-RH 6 Probanden

Insgesamt wurden etwa 1300 Serumbestimmungen durchgeführt. Davon entfielen ca. 350 auf Gn-RH, jeweils 300 auf LH und FSH und ca. 350 auf die Bestimmung der Steroidhormone Östradiol, Progesteron und Testosteron.

Es sei bereits an dieser Stelle erwähnt, daß alle Blutentnahmen um die gleiche Tageszeit erfolgten, um etwaige tagesrhythmische Schwankungen in der Gn-RH - Sekretion weitgehend auszuschließen.

Der Verfasser dankt an dieser Stelle nochmals allen beteiligten Probanden für ihre freiwillige Mitarbeit an der Entstehung dieser Arbeit.

III. ERGEBNISSE DES ASSAYS

1. Jodination

a) LPO-Methode

Nach der in Abschnitt II,2 angegebenen Methodik gelang die radioaktive Markierung mit der LPO-Methode. Es handelte sich dabei um eine Modifizierung der Versuchsanordnung nach SAXENA. Während der erste Kurvengipfel die Aktivität und damit das Erscheinen des freien ungebundenen Jod darstellt, durchläuft das markierte Hormon die Säule als Fraktionen 25 und 26 (Fig. 8).

Folgende Hypothese wurde angenommen, um das Auftreten von zwei Peaks zu erklären:

Grundlage der Säulenfiltration ist das Geltrennungsverfahren. Das in der Säule vorhandene Sephadexgel besitzt Poren von konstantem Durchmesser.

In Abhängigkeit von der Molekülgröße ändert sich die Zeit, mit der das aufgebrachte Material die Säule durchläuft, da die verschiedenen Moleküle unterschiedlich lange im Gel zurückgehalten werden. Das Auftreten vielgipfliger Kurven erklärt sich möglicherweise durch das Entstehen von Doppel- oder Dreifachmarkierungen (Fig. 11).

b) CAT-Methode

Fig. 10 zeigt eine Jodinationskurve nach der in Abschnitt II,2 beschriebenen CAT-Methode (modifiziert nach JEFFCOATE et al.). Das freie Jod erscheint in den Fraktionen 8 bis 11, das markierte Hormon in den Proben 22 bis 24.

2. Antiseren

a) Antiseren von DERMODY und JEFFCOATE

Nach dem in Abschnitt II,4 beschriebenen Assayaufbau wurden Antiseren von DERMODY und JEFFCOATE getestet. Wie aus Fig. 20 und Fig. 21 zu ersehen ist, zeigten beide Antikörper eine nur geringe Sensitivität, die sich unter anderem in dem nur geringen Anstieg der Standardkurven verdeutlicht.

Beide Antiseren genügten nicht der angestrebten Sensitivität für eine Gn-RH-Bestimmung.

b) Antiserum R-42 (NISWENDER)

Der von NISWENDER et al. entwickelte Antikörper R-42 wurde bei allen weiteren Versuchen verwandt. Er zeigte eine genügende Sensitivität und ermöglichte einen optimalen Anstieg der Standardkurve im Bereich der ermittelten Serumkonzentration. Dennoch war es nicht möglich, auf eine Serumextraktion zu verzichten. Die untere Nachweisgrenze betrug durchschnittlich 0,6 - 1,8 pg Gn-RH pro ml Serum.

c) Antiserum-Verdünnung

Verschiedene Antiserum-Konzentrationen wurden benutzt, um die optimale Verdünnung festzustellen. Bindungskontrollen und zugehörige Standardverdrängungen wurden bestimmt. Im Diagramm wurde der Punkt ermittelt, an dem die beiden Kurven den größten Abstand voneinander aufwiesen (Fig. 12 und 13).

Bei einer Konzentration von 1 : 16 000 wurden die besten Ergebnisse erzielt. In allen weiteren Versuchsreihen diente diese Verdünnung als konstante Mengenangabe des Antikörpers.

Bezogen auf das Gesamtassayvolumen von 0,4 ml entsprach das einer Endkonzentration von 1 : 64 000.

d) Bindungskapazität bei verschiedenen Inkubationszeiten

Bevor die in Abschnitt II,4 angegebene Inkubationszeit von 24 plus 8 Stunden ermittelt wurde, waren zahlreiche Untersuchungen notwendig, um diesen Wert festzulegen. Fig. 14 zeigt, daß die Bindungskapazität des Antikörpers nach den ersten 24 h nur unwesentlich zunahm.

Erfolgte jedoch die Tracerzugabe bereits am Beginn der Inkubation, so nahm die Steilheit der Standardkurve beträchtlich ab. Außerdem trat in den niedrigen Standardbereichen ein Hookeffekt auf (s. III,4 d). Eine erhebliche Sensitivitätssteigerung wurde erzielt, indem die Inkubationszeit durch spätere Tracerzugabe modifiziert wurde (Fig. 17).

Aus diesen Ergebnissen ergab sich die oben angeführte Inkubationszeit.

e) Kreuzreaktionen

Die Kreuzreaktionen mit verschiedenen Proteo- und Steroidhormonen wurden durchgeführt, um die Spezifität des

verwendeten Antiserums zu ermitteln und eventuelle Reaktionen, die die gemessenen Gn-RH-Werte verfälschen könnten, auszuschließen. Fig. 29, 30 und 31 zeigen die ermittelten Kurven. Wie daraus ersichtlich ist, wurden im Verhältnis zu den Gn-RH-Spiegeln, welche die Serumproben aufwiesen, sehr viel höhere Konzentrationen dieser "Fremdhormone" eingesetzt.

Dennoch zeigte sich in keinem Fall eine Verdrängung des Antikörpers aus der spezifischen AG/Ak-Bindung. Dies bewies die sehr hohe Spezifität des verwendeten Antiserums, das mit keinem der anderen Hormone eine Bindung einging.

Im einzelnen wurden folgende Hormone eingesetzt:

FSH, LH, ACTH, TSH, TRH, MIF, SIF, Vasopressin, Oxytocin, Östradiol und Testosteron.

Von NISWENDER et al. wurde der Antikörper außerdem gegen 17 verschiedene Gn-RH-Analoga getestet. Die dabei ermittelten relativen Bindungen mit den Analoga betrugen im Durchschnitt 1 %.

Es sei außerdem darauf hingewiesen, daß der R-42 - Antikörper C-spezifisch ist, d.h. das Hormonmolekül wird am C-terminalen Ende mit bovine-serum-albumin (BSA) verknüpft und so bei der Immunisierung der Kaninchen verwendet.

f) Trennung mit verschiedenen Mengen Äthanol abs.

Wie bereits erwähnt, erfolgte die Trennung des AG/Ak-Komplexes vom freien Hormonmolekül mit Äthanol abs.

Die Ergebnisse einer Versuchsreihe mit mehreren Volumina Äthanol ist in Fig. 15 dargestellt.

Deutlich ist der größte Abstand von Blankwert und Bindungskapazität (BK) bei der Verwendung von 1,5 ml Äthanol zu ersehen.

An dieser Stelle sollen einige Erläuterungen den Begriff des "Blank" näher charakterisieren.

In Abschnitt I,4 wurden Notwendigkeit und Verfahren einer Trennung im Assay erläutert. Alle bisher verwandten Trennungsverfahren arbeiten jedoch nicht hundertprozentig, d.h. die Trennung von freiem Antigen (Hormon) und AG/Ak-Komplex ist nicht absolut. Ein Teil des freien und radioaktiven Hormons wird beim Trennungsverfahren mit in den Bodensatz gezogen. So würde eine zu hohe Aktivität und damit eine zu geringe Hormonkonzentration im Serum gemessen werden. Der Blankwert ist also ein Maß für die störende Konzentration an gefälltem freien Hormon und muß bei der Berechnung der Serumwerte von den ermittelten Aktivitäten abgezogen werden. Gleichzeitig ist der Blank ein Maß für die Reinheit des markierten Materials.

Er bewegte sich bei den durchgeführten Versuchen zwischen 2,4 und 3,6 Prozent.

3. Extraktion

a) Verwendung von Diäthyläther und Dichlormethan

Die Extraktion mit DÄÄ und DCM brachte trotz guter Löslichkeit und relativ kurzer Vertreibungszeit nicht die gewünschten Ergebnisse.

Fig. 23 zeigt, daß die Recovery nur 1 bis 10 % betrug, also keine Serumbestimmungen erlaubte.

Ob störende Faktoren bei der Extraktion nur ungenügend ausgeschaltet wurden oder das Gn-RH selbst zum großen Teil eliminiert wurde, muß dahingestellt bleiben.

b) Extraktion mit Methanol

Erst die Extraktion mit Methanol ermöglichte ausreichende Recoverywerte. Fig. 22 stellt die Prozent-Wiederfindung (Recovery) bei der Verwendung verschiedener Serum- und Methanolmengen dar. Man erkennt, daß ein Verhältnis Serum : Methanol von 1 : 3 die höchsten Wiederfindungswerte erreichte.

Die wiedergefundene Menge hängt außerdem vom verwendeten Serumvolumen ab. Mengen unter 2 ml brachten zwar die besten Ergebnisse, die Sensitivität des Assays reichte jedoch nicht aus, um die dadurch bedingten niedrigeren Gn-RH-Konzentrationen zu erfassen.

4. Assay

a) Aufstellung von Standardkurven

Nach der in Abschnitt II,4 angegebenen Versuchsanordnung wurden Standardkurven aufgestellt. Wie bereits in einem der vorigen Abschnitte berichtet wurde, brachte eine Zweiteilung der Inkubationszeit und damit eine spätere Zugabe des markierten Hormons eine wesentliche Sensitivitätssteigerung (Vergleich der Fig. 16 und 17).

Zwölf jeweils im Verhältnis 1 : 2 verdünnte Standardlösungen von 1000 pg/ml bis 0,49 pg/ml wurden zugesetzt.

Man erkennt eine nahezu optimale Verdrängung durch das Antiserum bis zum Standard 62,5 pg/ml. Erst dann durchläuft die Kurve den Abschnitt ihres größten Anstiegs und wird im letzten Abschnitt wieder flacher.

Der 50 % Intercept-Punkt, d.h. die Standardkonzentration, bei der die Bindungskapazität 50 % beträgt, wurde mit 5,8 - 7,2 pg/ml bestimmt.

Die Bestimmung dieses Punktes sowie die gesamte Berechnung der Standardkurven und ermittelten Serumkonzentrationen erfolgte mittels EDV.

Ohne eine umfassende Abhandlung über die mathematische Berechnung derartiger Standardkurven geben zu wollen, sollen hier nur einige wenige Worte über die Auswertung der im Versuch gemessenen Zählraten fallen.

Bei der Gn-RH-Standardkurve - auch bei den Standardkurven anderer Radioimmunoassays - handelt es sich um eine Hyperbel ersten Grades. Den Leser möge dabei nicht die Figur der Kurve täuschen, die ja auf logit-log (doppelt logarithmisches Papier) aufgetragen ist.

Die Formel für die von der EDV geschätzten Eichkurve lautet:

$$\text{Dosis} = D\,50\ (100/\text{relative Bindung} - 1)^{1/B}$$

Dabei bedeuten:

Dosis = errechnete Hormonkonzentration

D 50 (Dosis 50) = diejenige Konzentration, bei der die Bindungskapazität 50 % beträgt

Relative Bindung: Sie ergibt sich aus folgender Beziehung:

$$\frac{100\ (\text{gezählte cpm} - \text{unspezifische cpm})}{\text{Bindungskapazität}}$$

Es sollen an dieser Stelle keine weiteren Einzelheiten aufgeführt werden. Die oben angegebenen Formeln mögen dem Leser nur einen kleinen Einblick in die Schwierigkeit der Berechnung derartiger Systeme ohne die Verwendung der EDV geben.

Analog zu der in Abschnitt III,2 d beschriebenen Inkubationszeitstudie wurden auch Veränderungen an der Standardkurve bei der Variation der Inkubationszeit ermittelt.

Fig. 26 zeigt jedoch, daß ein Anstieg der Erstinkubation ohne Tracer keine Sensitivitätszunahme zur Folge hatte. Es muß sogar festgestellt werden, daß die 24 + 8 Stunden-Inkubation den größten Kurvenanstieg besaß.

b) Kurvenbereich der Serumwerte

Die ermittelten Serumwerte lagen mit wenigen Ausnahmen im Bereich des steilsten Anstiegs der Standardkurve, der in Fig. 10 noch einmal als Ausschnitt dargestellt ist.

Dies ist ausnahmslos dem verwendeten Antiserum zu verdanken, das durch seine hohe Empfindlichkeit einen derartigen Kurvenverlauf zuließ.

Selbstverständlich ist die Genauigkeit der Bestimmung einer Konzentration um so größer, je steiler der Kurvenverlauf ist. Die Kurven in Fig. 20 und 21 zeigen die Verläufe von Standardkurven bei der Verwendung wesentlich unempfindlicherer Antiseren, was größere Ungenauigkeiten der Meßergebnisse beinhaltet.

c) Vergleich mit synthetischem Standard (PARLOW)

Der vom Autor in den Assays verwendete Standard (Hoe 471) wurde mit einem synthetischen Gn-RH-Standard nach PARLOW (Lot Nr. 21-103-DH) verglichen.

Die "relative potency" des Vergleichssubstrats betrug 68 für FSH (bestimmt im Bioassay) und 33 für LH (bestimmt im RIA). Wie aus Fig. 27 zu ersehen, ähneln sich die beiden ermittelten Kurven sehr stark. Im Mittel konnte eine Übereinstimmung zu 99,88 % gemessen werden.

d) Hook-Effekt

Zu einem früheren Zeitpunkt wurde bereits darüber berichtet, daß bei sofortiger Tracerzugabe am Inkubationsbeginn ein Wiederabsinken der Standardkurve in den niedrigen Standardkonzentrationen auftrat.

Das gleiche Phänomen wurde beobachtet, wenn die Gesamtaktivität abnahm oder die Antikörper-Konzentration anstieg. Man bezeichnet dies als H o o k e f f e k t oder "paradoxical binding" (RODBARD). Über die Entstehungsweise dieses Effekts besteht noch keine Klarheit. Hier soll keine Aufzählung der bestehenden Theorien erfolgen; es sei vielmehr auf die einschlägige Fachliteratur verwiesen.

Die Folgen eines derartigen Kurvenverlaufes liegen auf der Hand: a) Anstieg der unteren Nachweisgrenze (u.N.G.) und b) die Unmöglichkeit, im betroffenen Kurvenabschnitt Serumkonzentrationen zu errechnen.

Das Auftreten des Hookeffekts muß deshalb zum Zwecke der optimalen Genauigkeit der Serumbestimmung unbedingt vermieden werden.

5. Zuverlässigkeitskriterien des Assays

a) Bindungskontrollen

Nach jeder radioaktiven Markierung mußten Bindungskontrollen des gesamten zweiten Peaks (enthält markiertes Hormon) erfolgen. Dabei sollte man zweckmäßigerweise hohe Antiserumkonzentrationen verwenden, um das Vorhandensein von Hormon möglichst deutlich nachzuweisen.

In Fig. 11 ist der Verlauf der beiden Kurven dargestellt. Eine zusätzliche Prüfung der Fraktionen des ersten Peaks (freies Jod) kann durchgeführt werden, um die Selektivität der Gipfel auf der Jodinationskurve und damit die Genauigkeit der Gelfiltration in der Sephadexsäule nachzuweisen.

An dieser Stelle soll noch kurz auf die Bindungskapazität allgemein eingegangen werden.

Die aus den Abbildungen ersichtliche Bindungskapazität von 13 - 16 % mag auf den ersten Blick ausgesprochen niedrig erscheinen. Es sei jedoch auf die Festlegung der Antikörperkonzentration verwiesen (Abschnitt III,2 c), die 1 : 16 000 ergab.

Bei dieser Verdünnung folgte zwangsläufig die eingangs geschilderte Höhe der Bindungskapazität, mit der auch unter Betrachtung der Standardwerte optimale Verhältnisse gegeben waren. Höhere Bindungskapazitäten traten auf, wenn die verwendeten Antiseren eine niedrigere Sensitivität besaßen (Fig. 20 und 21 - Antikörper von DERMODY und JEFFCOATE) oder höhere Konzentrationen der Antikörper benutzt wurden.

b) Wiederfindung

Einer der Nachweise für die Sensitivität des Assays und die wirkliche Bestimmung humanen Gn-RH's war die Durchführung einer Wiederfindung (Recovery).

Folgende Versuchsanordnung wurde benutzt:

Serum wurde mit Aktivkohle im Verhältnis 50 mg Aktivkohle/ml Serum vermischt und 20 min. bei 10 000 Upm zentrifugiert.

Dadurch gelang eine Enteiweißung des Serums ("strippen"), die wie folgt kontrolliert wurde:

Dem Serum zugesetzter Tracer war nach dem Strippvorgang nicht mehr nachzuweisen, d.h. das Proteohormon war bei dem Verfahren entfernt worden.

Jeweils 1,9 ml des so enteiweißten Serums wurden 0,1 ml Standardlösung verschiedener Konzentrationen zugesetzt. Das Gemisch wurde extrahiert und die Menge des anschließend noch vorhandenen Standards im Assay bestimmt.

Fig. 25 zeigt die Ergebnisse des Versuches:

Je höher die zugesetzte Standardmenge war, um so größere Verluste traten bei der Wiederfindung auf.

Wurden bei Standard 0,49 pg noch 99 % wiedergefunden, so betrug die Recovery bei Standard 1000 pg nur noch 40 %. Diese kontinuierliche Recoveryabnahme mit dem Anstieg der Standardkonzentration mag zuerst ungewöhnlich erscheinen, man vergegenwärtige sich jedoch dazu die absoluten Mengen. Im übrigen betrug die Recovery im Bereich der gefundenen Serumkonzentrationen 80 - 100 %, unter deren Berücksichtigung die aktuelle Serumkonzentration mit ausreichend kleiner Abweichung ermittelt werden konnte.

Auch ein Vergleich der Standardkurve mit der Recoverykurve ergab analoge Ergebnisse (Fig. 24).

Relativ gute Übereinstimmung im Bereich der Serumwerte, dann einen kontinuierlichen Anstieg des Verlusts. Dennoch laufen beide Kurven insgesamt ausreichend parallel.

Zusammenfassend ist zu bemerken:

1. Laufende Wiederfindungskontrollen wurden durchgeführt, um die Konstanz des Verlusts zu beachten.
2. Die Recoverywerte müssen bei jeder Bestimmung berücksichtigt werden.
3. Im Bereich der gemessenen Serumkonzentrationen erreichte die Recovery einen ausreichenden Wert von 80 % und mehr.

c) Extraktion verschiedener Serummengen (Poolserum)

Als weiterer Nachweis für die Bestimmung endogenen Gn-RH's wurden verschiedene Serummengen extrahiert.

Die Hormonkonzentrationen in 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 4 ml und 8 ml eines Poolserums wurden im Assay bestimmt.

Die Ergebnisse zeigt Fig. 28. Mit ansteigender Serummenge steigt auch der gemessene Spiegel an Gn-RH. Die Kurve zeigt eine sehr gute Parallelität mit der Standardkurve, d.h. bei zweifacher Serummenge verdoppelt sich auch die Menge des ermittelten Gn-RH's. Die bei höheren Serumportionen auftretenden Verluste sind zu den mit ansteigender Standardkonzentration auftretenden Recoveryverlusten in Beziehung zu setzen; auch spielen hierbei versuchstechnische Gegebenheiten eine Rolle.

Die auftretende Parallelität mit der Standardkurve bewies aber die erfolgte Messung von e n d o g e n e m Gn-RH.

d) Intra- und Interassayvariabilität

Mit weiteren Tests wurde die Genauigkeit der Messungen und die Reproduzierbarkeit der Assays bestimmt.

Zur Überprüfung der Meßgenauigkeit diente die Bestimmung des Intraassaykoeffizienten, also der Abweichung von einer gemessenen Probe innerhalb eines Assays. Dazu wurden acht Proben eines Serums bestimmt und die Werte zueinander in Beziehung gesetzt.

Dabei ergab sich ein Koeffizient von 5,7 %.

Der Interassaykoeffizient, d.h. die Reproduzierbarkeit des gemessenen Wertes, betrug bei den durchgeführten Versuchen 10,5 %.

Zur Bestimmung dieses Koeffizienten wurde ein Kontrollserum benutzt, das in jedem Versuchsaufbau mitbestimmt wurde.

Die gemessenen Hormonspiegel dieses Kontrollserums wurden verglichen; es ergab sich der oben aufgeführte Koeffizient.

Beide Testreihen zeigten sehr gute Ergebnisse und bestätigten die hohe Spezifität und genaue Reproduzierbarkeit des Assays bzw. der Meßwerte.

IV. ANWENDUNG DES ASSAYS FÜR SERUMBESTIMMUNGEN

1. Haltbarkeit von endogenem Gn-RH im Vollblut

Bei allen Serumbestimmungen wurde bereits das gewonnene Material möglichst kurz nach der Entnahme vom Probanden bei -30° C tiefgefroren und bis zur Verwendung gelagert.

Die im folgenden beschriebene Studie beschäftigte sich jedoch mit den Auswirkungen einer längeren Aufbewahrung des Serums bei +4° C. Von einer Versuchsperson wurde Serum unterschiedlich lange gelagert. Die Auswirkungen zeigt Fig. 32.

In den ersten sechs Stunden nach der Blutentnahme sinkt der Spiegel von 4,5 pg/ml auf 3,6 pg/ml, wobei der Abfall besonders zwischen 3 und 6 Stunden signifikant ist; das bedeutet einen Verlust von 20 %. Anschließend trat keine weitere Veränderung des Serumspiegels ein. In einem Zeitraum von 12 Stunden betrug der durchschnittliche Abklingverlust 0,075 pg/h = 1,67 % des Ausgangswertes.

In der angewandten durchschnittlichen Aufbewahrungszeit von 0 bis 3 Stunden gingen 4,4 % verloren, eine relativ geringe - wenn auch nicht zu vernachlässigende Menge.

Die Ursachen des Abfalls sind wohl in der Schädigung des Hormonmoleküls durch die Temperatur zu suchen. Ein möglicher bedeutender fermentativer bzw. chemischer Abbau oder Inaktivierungsprozeß kann zwar nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber eher unwahrscheinlich.

2. Bestimmung der Halbwertszeit von exogenem (endogenem?) Gn-RH

Mit Hilfe eines Gn-RH-Tests wurde die Gn-RH-Halbwertszeit bestimmt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

Der Patientin wurden zum Zeitpunkt t = 0 25 ug synthetisches LH-RH (Hoe 471) i.v. injiziert. Die Hormonkonzentrationen wurden fortlaufend nach 5 min., 10 min. usw. bestimmt (Fig. 33).

Der 5 min. nach der Injektion gefundene Wert betrug beispielsweise 2440 pg/ml.

Unter Berücksichtigung der stark erhöhten Spiegel erfolgte die Bearbeitung der Proben mit weitaus höheren Verdünnungen. Außerdem wurde ein Ausgangswert gemessen. Der Kurvenverlauf entsprach den Erwartungen.

Mit fortlaufender Zeit sanken die Gn-RH-Konzentrationen kontinuierlich ab, wodurch es möglich war, die Halbwertszeit des injizierten Hormons zu berechnen.

Sie stellte sich als einfache lineare Regression dar und betrug 4'54''.

Es muß berücksichtigt werden, daß hierbei synthetisches LH-RH bestimmt wurde. Dennoch scheint es wahrscheinlich, den ermittelten Wert auch auf endogenes Gn-RH beziehen zu können, der in dieser Größenordnung bereits von verschiedenen Endokrinologen angegeben wurde (SCHALLY et al.: t 1/2 = 4 - 6 min.).

Dabei ist zu bedenken, daß das Standardhormon in jedem RIA dem endogenen Hormon gleichgesetzt wird und nach den Erfahrungen des Autors auch nahezu volle biologische Aktivität entfaltet. Letzteres ist auch am Verhalten der FSH- und LH-Konzentrationen zu ersehen, die erwartungsgemäß nach der LH-RH-Injektion deutlich anstiegen. Es sei

daran erinnert, daß von nahezu allen Autoren, die auf diesem Gebiet arbeiten, die Möglichkeit, das verwendete synthetische Material entspreche in seiner Wirkung nicht dem natürlichen Hormon, als höchst unwahrscheinlich angesehen wird (SCHALLY et al.).

Bei der Berechnung wurde ebenfalls vorausgesetzt, daß sich die injizierte Hormonmenge in einem Blutvolumen von ca. 5 Litern gleichmäßig verteilte.

3. Serumspiegel bei Männern

Bei 18 männlichen Probanden in verschiedenen Lebensaltern wurden Serumbestimmungen durchgeführt und altersabhängig verglichen.

In der Altersgruppe 20 bis 30 Jahre fanden sich Spiegel von 5,9 bis 3,5 pg/ml, die kontinuierlich mit ansteigendem Alter abnahmen. Fig. 34 zeigt den Verlauf der Kurve.

Zur Überprüfung der hormonellen Verhältnisse der Probanden wurden ihre Gonadotropinspiegel und Testosteronwerte bestimmt. Diese lagen durchweg im Bereich der Norm - so Testosteron zwischen 2,5 und 8,7 ng/ml in Abhängigkeit vom Alter. Damit konnte sichergestellt werden, daß nur hormonell "normale" Probanden der Versuchsreihe angehörten, und Verfälschungen der Ergebnisse durch das Auftreten pathologischer Werte wurden vermieden.

Auf die Auswertungen dieser Resultate soll im nachfolgenden Kapitel eingegangen werden (V,2). Es sei an dieser Stelle nur auf den analogen Verlauf der Testosteronwerte in bezug zum Lebensalter einleitend hingewiesen.

4. Serumspiegel bei Frauen

In verschiedenen Lebensaltern wurden analog zu der im oberen Abschnitt beschriebenen Testreihe Serumspiegel von Gn-RH bei Frauen bestimmt.

Die Ergebnisse sind aus Fig. 35 ersichtlich.

Wieder wurden zur Ausschaltung pathologischer Hormonverhältnisse sowohl Gonadotropin- als auch Östrogen- und Progesteronbestimmungen durchgeführt, die in Abhängigkeit vom Zyklustag und unter Berücksichtigung des Alters der Probandinnen alle im Normbereich lagen. Auf den Zusammenhang zwischen Zyklusphase und Gn-RH - Sekretion wird an anderer Stelle eingegangen.

Als wesentliches Merkmal des ersten Kurvenabschnittes sei jedoch auf die großen Schwankungen vom Mittelwert hingewiesen. Bei Frauen in der frühen Postmenopause steigen die Spiegel stark an (Steigerung bis zu 50 %), ein Phänomen, das auch von den Gonadotropinen LH und FSH bekannt ist.

In der späten Postmenopause sinken dagegen die Serumkonzentrationen sogar unter die Werte des regenerationsfähigen Alters ab.

Der Kurvengipfel ist bei Frauen in der Postmenopause nach 8 bis 12 Jahren überschritten.

5. Serumspiegel bei Frauen in der Postmenopause

Eine besondere Untersuchungsreihe beschäftigte sich mit den Gn-RH-Werten um die Menopause. Auch aus dieser Kurve (Fig. 36) ist der Einfluß der hormonellen Veränderungen, die um die Menopause auftreten, auf die Gn-RH - Sekretion ersichtlich. Die Kurve zeigt außerdem, daß die Gn-RH-Spiegel bereits sehr kurze Zeit nach Sistieren der Periode (1 bis 2

Jahre) stark anzusteigen beginnen und über annähernd zehn Jahre erhöht bleiben. In den letzten Jahren vor der Menopause ist ein leichter Abfall der Gn-RH-Werte zu erkennen.

Interessant erscheint die Beobachtung, daß bei Frauen, deren Menopause erst spät auftritt, auch die Gn-RH-Spiegel bis zu diesem Zeitpunkt niedrig bleiben. Das ist zwar ein einleuchtender, leicht verständlicher Aspekt, er deutet aber auf ein enges Zusammenspiel zwischen der Sekretion der Steroidhormone und der Gn-RH - Ausschüttung im Sinne eines negativen feedback-Mechanismus hin.

6. Serumspiegel bei Kindern vor und nach der Pubertät

Die Versuchsgruppe "Serumspiegel von Gn-RH bei Kindern" umfaßte 20 Probanden vor und nach Eintritt der Pubertät (8 männliche und 12 weibliche Individuen - jeweils 50 % prä- und postpubertär). Bei der Festlegung des Pubertätsbeginns wurde der Entwicklungsstand anhand der Regel nach TANNER berücksichtigt. Aus Mangel an Untersuchungsmaterial mußte auf die Bestimmung anderer Hormone verzichtet werden; bei keinem der Probanden lagen jedoch Hinweise auf eine hormonabhängige pathologische Situation vor.

Die ermittelten Werte zeigen die Fig. 37 und 38.

Bei männlichen Probanden fiel ein leichter, aber deutlicher Abfall der Gn-RH-Werte mit zunehmendem Alter auf (Fig. 37). Wenn auch das Untersuchungsmaterial zahlenmäßig eher gering war, so müssen diese Ergebnisse doch Beachtung finden, insbesondere im Hinblick auf die Konzentrationen der Hypophysen- und Steroidhormone vor der Pubertät (s. Abs. V,5).

Bei der Gruppe der weiblichen Individuen war der Abfall der Kurve kaum ausgeprägt. Auffallend ist jedoch (Fig. 38) der Anstieg der Abweichungen vom Mittelwert, der besonders um den Termin der Menarche signifikant wird.

Auf die Bedeutung im Hinblick auf die Gn-RH - Sekretion während des weiblichen Zyklus wird an späterer Stelle eingegangen werden (s. Abs. V,6-9).

7. Untersuchungen im weiblichen Zyklus

Diese Studie umfaßte sechs biphasisch verlaufende Zyklen. Fig. 6 stellt die normalen hormonellen Verhältnisse während eines weiblichen Zyklus dar. Man erkennt deutlich die zweigipflige Östrogenkurve, den postovulatorischen Progesteronanstieg, den die Ovulation beeinflussenden LH-Peak und den zu Beginn des Zyklus und präovulatorisch auftretenden Anstieg der FSH-Sekretion. Im unteren Teil der Abbildung ist der Verlauf der Basaltemperaturkurve zu verfolgen, die den typischen biphasischen Verlauf mit postovulatorischem Temperaturanstieg zu erkennen gibt.

Die Meßergebnisse sind auf den Fig. 39 bis 44 abgebildet.

Neben den Gn-RH-Werten wurden LH, FSH, Östradiol, Progesteron und die Basaltemperatur bestimmt.

Auf Einzelheiten in der Kurvendeutung wird an anderer Stelle eingegangen (s. Abs. V,6-9), hier sollen nur einige allgemeine Aspekte besprochen werden.

Wie bereits zu Beginn der vorgelegten Arbeit erwähnt wurde, erfolgten alle Blutentnahmen zur gleichen Tageszeit (morgens), um tageszeitliche Schwankungen, die selbstverständlich insbesondere diese Untersuchungsreihe empfindlich stören konnten, weitgehend auszuschalten.

Bei allen Zyklen ist der LH-Peak und der folgende Anstieg des Progesteron-Spiegels als Hinweis auf eingetretene Ovulationen deutlich zu erkennen (Fig. 41).

Das Verhalten der anderen Hormone lag im Bereich der Norm, ebenso der Verlauf der Basaltemperatur.

Es soll nicht Aufgabe dieses Kapitels sein, die Beziehungen zwischen Gn-RH und den anderen Hormonen zu untersuchen.

Bei der Betrachtung der Gn-RH-Spiegel kann aber folgendes festgestellt werden:

a) Alle Zyklen zeigen mit geringen Einschränkungen einen hohen Spiegel in den ersten Tagen.

b) Eine leicht erhöhte Gn-RH - Sekretion kann regelmäßig 1-4 Tage (im Mittel 2 Tage) vor dem LH-Peak nachgewiesen werden.

c) Bei allen Zyklen ist ein Gn-RH-Abfall 2-4 Tage vor Beginn der Menstruationsblutung zu erkennen.

d) Die Meßwerte von Gn-RH schwanken im Verlauf des Zyklus zum Teil erheblich (was die unter a - c aufgestellten Behauptungen nicht entkräftet).

Fig. 45 zeigt den Verlauf der Gn-RH-Spiegel und der anderen Hormone in bezug zum LH-Peak.

Es handelt sich bei den Kurven um die errechneten Mittelwerte der sechs untersuchten Zyklen.

Aus dieser Abbildung sind die aufgestellten Behauptungen noch einmal übersichtlicher zu ersehen.

Wie oben angegeben, wird auf die Möglichkeiten der Deutung und die daraus folgenden Konsequenzen noch eingegangen werden.

8. Kurzzeitstudie über die fluktuierende Ausschüttung von Gn-RH und hypophysären Gonadotropinen

Ziele dieser letzten Versuchsreihe waren:

a) Untersuchung des Einflusses von Gn-RH auf LH- und FSH-Sekretion.

b) Hinweise dafür zu finden, ob eigenständige LH-RH und FSH-RH existieren.

c) Untersuchung der kurzzeitigen hypothalamischen Aktivität.

An drei männlichen und drei weiblichen Probanden erfolgten über einen Zeitraum von 90 min. kontinuierliche Blutentnahmen in 5 min.-Abständen.

Die Serumkonzentrationen von Gn-RH, LH und FSH wurden radioimmunologisch bestimmt und zueinander in Beziehung gesetzt (Fig. 46-51).

Da nach Ansicht des Autors die hypothalamische Aktivität einen sehr komplexen Vorgang darstellt, wurde auf Einflüsse aus der Umwelt, die während der Blutentnahmen auf die Probanden einwirkten, geachtet und versucht, neben den rein somatischen auch psychische Phänomene zu erfassen und in die Interpretation der Ergebnisse einzugliedern (s. Abs. V,12).

V. DISKUSSION

1. Halbwertszeit von Gn-RH

Wie bereits in Abs. IV,2 erwähnt, handelte es sich bei der Bestimmung der Halbwertszeit um die Messung exogen zugeführten Gn-RH's.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die endogenen Spiegel erscheint aus den oben angegebenen Gründen gerechtfertigt. Die anatomischen Gegebenheiten bedingen die Schwierigkeiten dieser Untersuchung, welche für alle angeführten Versuchsreihen gilt. Nach seiner Sekretion aus den Kernen des Hypothalamus ist das Hormon in relativ hoher Konzentration im hypophysären Portalkreislauf zu finden, wie aus Versuchen bei Affen bekannt ist. Selbstverständlich ist dieses Gebiet Forschungszwecken beim Menschen nicht zugänglich.

Weiterhin ist bewiesen, daß bereits in diesem Abschnitt des Kreislaufes eine hohe Aktivität spezifischer Peptidasen vorhanden ist, die das Hormonmolekül zu einem großen Prozentsatz inaktivieren. Eine der wichtigsten Mechanismen für diesen schnellen Abbau von Gn-RH dürfte die Abspaltung von (pyro) Glu-His vom N-Terminal des Moleküls sein (REDDING et al.). Zwar existieren derartige abbauende Enzyme auch in anderen Regionen des Organismus, z.B. in der Leber, doch sind diese quantitativ weniger von Bedeutung.

Vergegenwärtigt man sich außerdem die Volumenkapazität des hypophysären Portalkreislaufes im Vergleich zum Gesamtblutvolumen, so fällt der hohe Verdünnungsfaktor beim Übertritt des Hormons ins periphere Blut deutlich ins Gewicht.

Aus allen diesen Betrachtungen soll die Schwierigkeit des Nachweises von endogenem Gn-RH hervorgehen, wobei die Halbwertszeit des Hormons nur eine, allerdings sehr bedeutende, Komponente darstellt.

2. Serumspiegel bei Männern

Es ist offensichtlich, daß eine nur geringe Zahl von Probanden, wie sie hier vorlag, nicht mehr als vorsichtige und sicherlich nicht völlig umfangreiche Interpretationen erlaubt. Dennoch erscheint es sinnvoll, Theorien über die hormonellen Zusammenhänge, die sich nicht nur aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihe ergeben, aufzustellen, da das gesamte Gebiet noch weitgehend wenig erforscht ist.

Wie bereits ausgeführt wurde, korreliert der altersabhängige Abfall der Gn-RH-Serumkonzentrationen sehr gut mit den Werten für Testosteron, dem Hauptvertreter der Androgene. Da bekannt ist, daß mit ansteigendem Lebensalter ebenfalls der LH-Spiegel ansteigt (negativer feedback-Mechanismus mit dem Testosteron), liegt es auf der Hand, die Hypophyse in dieses Reglersystem miteinzubeziehen.

Folgende Theorie kann angenommen werden:

Es bestehen sowohl zwischen Hoden und Hypophyse als auch zwischen Hypophyse und Hypothalamus negative feedback-Regelkreise, die die Ursache der gefundenen Ergebnisse darstellen könnten.

Von einigen Autoren wurden bereits Androgen-sensible Rezeptoren im Hypothalamus postuliert (KUSCHINSKY). Ein derartiger direkter Angriffspunkt der Androgene im Zentrum der Gn-RH - Sekretion konnte mit den Versuchsergebnissen nicht nachgewiesen, allerdings auch nicht unbedingt widerlegt werden.

Es muß deshalb offen bleiben, in welchem Ausmaß dieser "ultra-long feedback" wirkt. Ein zumindest regulierender Eingriff in diesem System durch die Hypophyse erscheint jedoch naheliegend.

3. Serumspiegel bei Frauen

Wie die Untersuchungen der Gn-RH - Sekretion im weiblichen Zyklus bestätigen, konnten Korrelationen zwischen den Serumwerten dieses Releasing-Hormons und der Zyklusphase gefunden werden.

Damit erklärt sich die große Streubreite der Spiegel während des gestationsfähigen Alters.

Signifikant ist vor allem der Anstieg nach der Menopause. Hier scheint ein dominierender Einfluß der Steroidhormone am Hypothalamus vorzuliegen, der ebenso bei den Gonadotropinen bekannt ist. SEYLER und REICHLIN wiesen nach, daß Östrogene die Gn-RH - Sekretion beeinflussen können. Östrogen- bzw. Progesteronwerte scheinen im Rahmen eines negativen feedback-Mechanismus sowohl an der Hypophyse als auch am Hypothalamus regulierend einzugreifen (BARRACLOUGH, SCHNEIDER et al.). Der in der späten Postmenopause auftretende Gn-RH-Abfall verläuft ebenfalls analog zur LH- und FSH-Sekretion.

Es muß dahingestellt bleiben, ob die Hypophyse ihrerseits Einfluß auf die hypothalamische Aktivität nimmt.

4. Serumspiegel bei Frauen in der Postmenopause

Nur kurz sei an dieser Stelle noch einmal auf Fig. 36 hingewiesen (s. auch Abs. IV,5). Die Dauer der erhöhten Gn-RH - Sekretion scheint nur ca. 70 % der postmenopausalen Gonadotropinphase auszumachen. Steigerungen bis zu 70 % im Verhältnis zur "Basalsekretion" des Releasing-Hormons konnten beobachtet werden. Die Versuchsreihe bestätigte und ergänzte die Beobachtungen, die bei Frauen in verschiedenen Lebensaltern gemacht werden konnten.

5. Serumspiegel bei Kindern

Die Spiegel, welche bei männlichen Kindern gefunden wurden, sind nur sehr schwer zu interpretieren. Der mit Eintritt der Pubertät eintretende Abfall der Gn-RH-Werte scheint den Beobachtungen bei Männern zu widersprechen. So ist bekannt, daß präpubertär nur niedrige Androgenspiegel nachweisbar sind. Da jedoch auch die hypophysäre Gonadotropinsekretion zu diesem Zeitpunkt noch gering ist, scheint die Diskrepanz zwischen der in Abschnitt V,2 geäußerten Theorie und den hier vorgetragenen Ergebnissen nicht mehr so schwerwiegend.

Vielmehr muß angenommen werden, daß vor Eintritt der Geschlechtsreife der postulierte feedback-Mechanismus noch nicht oder zumindest nur stark abgeschwächt wirksam ist und möglicherweise von anderen Regelkreisen überlagert wird.

Die bei Männern auftretenden Verbindungen zwischen Gn-RH - und Gonadotropinsekretion konnten somit auch in dieser Versuchsreihe bestätigt werden.

Bei Mädchen blieben die Gn-RH-Werte in Abhängigkeit vom Lebensalter weitgehend konstant. Es scheint somit festzustehen, daß der Eintritt der Pubertät an der hypothalamischen Aktivität kaum ablesbar ist. Die starken Abweichungen vom Mittelwert, die postpubertär auftraten, müssen mit zyklusabhängigen Schwankungen der Gn-RH - Sekretion erklärt werden.

6. Verhalten von Gn-RH im weiblichen Zyklus

Die Beobachtungen dieser Studie sind bereits großenteils in Abschnitt IV,7 widergegeben.

Es ist nur unter der analytischen Betrachtung von Einzelphänomenen möglich, die anscheinend sehr komplexen und umfangreichen Beziehungen zwischen der Gn-RH - Sekretion und dem Verlauf der anderen Hormonkurven zu erfassen. Erkennbar ist, daß die Aktivität des Hypothalamus zum Teil stark schwankt, was zumindest teilweise zyklusabhängig erscheint.

Im folgenden sollen einige der Beobachtungen herausgegriffen und der Versuch einer Interpretation unternommen werden. Zum Zwecke der besseren Übersicht sei auf die Ergebnisse in Fig. 45 hingewiesen.

7. Gn-RH während der Menstruation

Alle untersuchten Zyklen (Fig. 39-44) zeigen eine deutliche, wenn auch nur leichte Erhöhung der Gn-RH - Ausschüttung während der Menstruation für 2 bis 4 Tage, eine Beobachtung, die auch vom FSH bekannt ist. Dies ist möglicherweise ein Hinweis für die Beantwortung der Frage, ob ein eigenständiges FSH-Releasing-Hormon existiert, worauf an anderer Stelle (Abs. V,11) eingegangen wird.

Es sei darauf verwiesen, daß die auslösende Ursache des weiblichen Zyklus noch immer unbekannt ist. Mit hoher Wahrscheinlichkeit dürfte auch das Gonadotropin-Releasing-Hormon nicht der grundlegende Faktor sein. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen jedoch die Aktivität eines hochgelegenen Abschnitts des hormonellen Systems beim

Menschen und könnten eine der Grundlagen für die Erforschung der corticalen Einflüsse auf das Zyklusgeschehen darstellen.

8. Existiert eine mittzyklische Erhöhung von Gn-RH?

Die Frage, ob der in der Mitte des Zyklus auftretende LH-Peak von einer mittzyklischen Erhöhung der Gn-RH - Sekretion begleitet bzw. ausgelöst wird, kann nach den hier vorliegenden Untersuchungsergebnissen nicht mit absoluter Sicherheit beantwortet werden. Es ist allerdings festzustellen, daß in allen Zyklen um den Zeitpunkt der Ovulation leicht erhöhte Gn-RH-Werte gemessen werden konnten. Diese gesteigerte hypothalamische Aktivität war 1 bis 4 Tage (im Durchschnitt 2 Tage) vor Auftreten des LH-Peaks vorhanden. Interessanterweise folgte diese Beobachtung einer kurzdauernden Erniedrigung der Gn-RH-Serumspiegel (vgl. Fig. 39, 40, 42, 43 und 44). In diesem Zusammenhang sei auf die Arbeit von GLÄSSER verwiesen, in der eingehendere Untersuchungen der Beziehung zwischen Gn-RH - Sekretion und Auslösung des LH-Peaks durchgeführt wurden. Die hier angewandten 24-h-Abstände der Messungen erscheinen nicht ausreichend, einen möglichen präovulatorischen Gn-RH-Gipfel zu erfassen.

Zusammenfassend wäre zu bemerken:

Der LH-Gipfel, der in unmittelbarem Zusammenhang mit der Auslösung der Ovulation steht, scheint durch eine erhöhte hypothalamische Aktivität mitausgelöst zu sein. Nach neueren Untersuchungen (ODELL, LEYENDECKER) ist jedoch bekannt, daß auch die Steroidhormone, insbesondere das Progesteron, auf die Auslösung der gesteigerten hypophysären LH-Sekretion Einfluß nehmen.

Wie aus den Kurven Fig. 39-45 zu ersehen ist, konnte auch in den hier vorliegenden Untersuchungen eine geringe, jedoch scheinbar bedeutsame Erhöhung der Progesteron-Ausschüttung 1 bis 2 Tage vor dem LH-Peak nachgewiesen werden.

Ob dieser Anstieg Auswirkungen am Hypothalamus, an der Hypophyse oder an beiden Strukturen bedingt und damit deren Hormonsekretion stimuliert, muß offen bleiben.

Abschließend sei darauf hingewiesen, daß auch andere Autoren (ARIMURA, MALACARA et al.) einen geringen Anstieg der hypothalamischen Aktivität kurz vor dem LH-Peak nachgewiesen haben.

9. Gn-RH und Östrogene

Bereits im Abschnitt über die Untersuchung von Gn-RH - Serumspiegeln bei Frauen ist auf den anscheinend direkten Zusammenhang zwischen Östrogensekretion und hypothalamischer Aktivität hingewiesen worden. Die Zyklusmessungen zeigen in der Mehrzahl ein ähnliches Bild. Der 1 bis 2 Tage vor dem LH-Peak auftretende erste Östrogengipfel korreliert zeitlich mit dem Gn-RH-Abfall, der vor der erhöhten präovulatorischen Phase des Releasing-Hormons liegt. Möglicherweise bestehen hier gonadal-hypothalamische Regulationen, die jedoch nach den hier vorliegenden Ergebnissen nur hypothetisch angenommen werden können.

Es ist bemerkenswert, daß das kurz vor der Menstruation auftretende Absinken der Gn-RH-Spiegel besonders deutlich war, wenn im Zyklusverlauf ein starker zweiter Östrogengipfel auftrat.

Diese Verbindung korrelierte zeitlich auffallend gut (Fig. 39, 40, 41). Demnach muß als zutreffend angenommen werden, daß die Gn-RH - Sekretion scheinbar auch durch die inkretorische Funktion der Ovarien beeinflußt wird, eine Beobachtung, die auch von SEYLER und REICHLIN bereits angenommen wurde.

10. Fluktuation von Gn-RH und Gonadotropinen

Seit einiger Zeit ist bekannt, daß Fluktuationen in der hormonellen Aktivität des Hypothalamus bestehen (JEFFCOATE, SEYLER, REICHLIN). Bisherige Untersuchungen, die durchweg 10- bis 20-minütige Abstände der Messungen benutzten, konnten eine zeitliche Korrelation zwischen Gn-RH - Sekretion und konsekutiver hypophysärer Aktivität nicht nachweisen (SEYLER und REICHLIN).

In dieser Studie (Fig. 46-51) erfolgten die Blutentnahmen in 5-Minutenabständen, also annähernd der Halbwertszeit von Gonadotropin-Releasing-Hormon.

Damit sollte verhindert werden, daß mögliche kurzzeitige Verbindungen der hypothalamischen und hypophysären Inkretion durch zu lange Meßabstände verschleiert würden.

Die Untersuchungen zeigten folgende Ergebnisse:

a) Ein zeitlich eindeutiger Einfluß von Gn-RH auf die LH- oder FSH-Ausschüttung war nicht festzustellen. Zwar konnten immer wieder Abschnitte gefunden werden, die in um 5- bis 10-minütig versetzten Abständen Parallelen zwischen den Kurven aufwiesen; daneben imponierten jedoch völlig konträre Kurvenverläufe (s. Fig. 46, 49, 50, 51).

b) Sowohl LH als auch FSH reagierten zeitweise auf Gn-RH - Reiz.

c) Ein direkter negativer "feedback-Mechanismus" zwischen Hypothalamus und Hypophyse erscheint möglich.

11. Existieren eigenständige Gonadotropin-Releasing-Hormone (LH-RH und FSH-RH)?

Trotz zahlreicher Untersuchungen konnte bis heute ein eigenständiges FSH-RH beim Menschen nicht nachgewiesen werden. Mehr als 100 Gn-RH-Analoga sind synthetisiert worden, ohne daß eine separierte LH-RH- bzw. FSH-RH-Aktivität gefunden wurde. Führende Endokrinologen, so SCHALLY, ARIMURA und JEFFCOATE, die maßgeblichen Anteil an der Entwicklung von RIA's für humanes Gn-RH besitzen, lehnen nach den bisher vorliegenden Daten die Existenz eines FSH-Releasing-Hormons ab.

Die im Verlauf der dargelegten Arbeit ermittelten Ergebnisse können diese Ansicht nur bestätigen.

Folgende Fakten bekräftigen diese Annahme:

a) Im Zyklus auftretende zeitlich parallele Erhöhungen der Gn-RH- und FSH-Spiegel.

b) Zeitweilige direkte Abhängigkeit der FSH-Sekretion von Gn-RH in der Fluktuationsstudie.

c) Deutlicher Anstieg von LH und FSH im Serum nach Injektion von synthetischem LH-RH (Fig. 33).

Sicherlich ist die Diskussion über eigenständige Releasing-Hormone für LH und FSH nicht abgeschlossen (Arbeiten von SHIN und KRAICER). Bei allen durchgeführten Versuchsreihen

zeigte sich kein Hinweis auf die Existenz eines humanen FSH-RH.

Deshalb wurde vom Autor der Begriff "Gonadotropin-Releasing-Hormon" verwendet, welches möglicherweise beide Hypophysenhormone beeinflußt.

Ein gleiches Phänomen ist auch vom Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) bekannt, das aus der Hypophyse sowohl TSH als auch Prolaktin freisetzt.

12. Einfluß psychischer Faktoren auf die Gn-RH - Sekretion

Schon in der Einleitung wurde darauf aufmerksam gemacht, daß die hypothalamische Aktivität mit großer Wahrscheinlichkeit von Einflüssen der Cortex und des Limbischen Systems abhängt. Umwelteinflüsse, Spannungssituationen - und dadurch ausgelöste psychische Sensationen - bewirken vielleicht Änderungen der Sekretionen von Hypothalamus und Hypophyse.

In der Versuchsreihe "Gn-RH - Fluktuationsstudie" bewirkten Faktoren wie Müdigkeit oder das Verlangen nach Nikotingenuß deutliche Änderungen der Hormonspiegel. Welche neuronalen Strukturen dabei Einfluß nehmen, kann nur Gegenstand der Hypothese bleiben.

Seit langem ist bekannt, daß psychische Faktoren den weiblichen Zyklus verändern können. In der Struktur des Hypothalamus sind ein tonisches und ein nur bei Frauen aktives rhythmisches Zentrum voneinander abzugrenzen.

Ob dadurch Verbindungen zwischen Psyche und inkretorischem System bestehen, sei dahingestellt.

Immerhin bedingt diese geschlechtsspezifische Abweichung der anatomischen Strukturen eventuell die unterschiedlichen Auswirkungen der männlichen und weiblichen Steroidhormone auf die Gn-RH - Sekretion des Hypothalamus.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde ein Radioimmunoassay zum Nachweis humanen Gn-RH's entwickelt und für zahlreiche Untersuchungen der Hormonphysiologie des Menschen angewandt, deren Ergebnisse wie folgt dargestellt werden können.

Die Gn-RH - Ausschüttung ist in wechselndem Ausmaß abhängig von hormonellen Einflüssen der Gonaden, der Hypophyse, psychischen Bedingungen und wahrscheinlich auch von corticalen und subcorticalen Strukturen.

Die Serumspiegel von endogenem Gonadotropin-Releasing-Hormon werden außerdem von Lebensalter und Geschlecht bestimmt und betragen in Abhängigkeit der verschiedenen Faktoren 0,5 bis annähernd 10 pg/ml Serum (bestätigt von JEFFCOATE et al.).

Den in früheren Arbeiten (SEYLER und REICHLIN) vertretenen Ansichten, die Gn-RH-Serumspiegel lägen im Bereich von 0,4 - 1,4 ng/ml, muß widersprochen werden.

Gn-RH scheint eine wichtige Rolle im Ablauf des weiblichen Zyklus zu besitzen. Auf die verschiedenen engen Zusammenhänge der einzelnen Hormone wurde mehrfach hingewiesen.

Die sehr komplexen und nur zum Teil bekannten Regulations- und Steuerungsmechanismen weisen auf ein sehr fein eingestelltes System hin, in dem die Hormonsekretion des Hypothalamus eine bedeutende, wenn auch nicht allein steuernde Wirkung besitzt.

Die aufgeführten Meßergebnisse zeigen die Bedeutung des Hypothalamus als hormonelle Struktur, ohne dabei die Einflüsse von Hypophyse und Gonaden vernachlässigen zu wollen. Insbesondere scheinen die Steroidhormone in diesem

System von großer Wichtigkeit zu sein.

Erst künftige Untersuchungen, insbesondere der mit dem Diencephalon in Verbindung stehenden Hirnabschnitte, werden weitere Grundlagen der humanen Hormonphysiologie aufdecken.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. ANDERSON L.L., BLAND K.P., and MELAMPY R.M.
Comparative aspects of uterine-luteal relationships
Recent Progr. Hormone Res. 25: 57 (1969)

2. ANIANMA et al.
Radioimmunoassay
Endocrinology 93: 1092 (1974)

3. ARIMURA A., SATO H. et al.
Production of Antiserum to LH-Releasing Hormone (LH-RH) Associated with Gonadal Atrophy in Rabbits: Development of Radioimmunoassays for LH-RH
Endocrinology 93: 1092 (1973)

4. BARKER H.M. et al.
Radioimmunoassay of Luteinizing Hormone Releasing Hormone
Received November 27, 1972

5. BARRACLOUGH C.A. and HALLER E.W.
Positive and negative feedback effects of estrogen on pituitary LH synthesis and release in normal and androgen-sterilized female rats
Endocrinology 86: 542 (1970)

6. BASSIRI Rahim M. and UTIGER Robert D.
The Preparation and Specificity of Antibody to Thyrotropin Releasing Hormone
Endocrinology 90: 722 (1972)

7. BROTHERTON J.
Sex Hormone Pharmacology
Department of Gynaecological Endocrinology, Sterility and Family Planning,
Division of Obstetrics and Gynaecology,
Klinikum Steglitz of the Free University, West Berlin, Germany
Academic Press (1976)

8. CHRAMBACH A.
Multiphasic Buffer System
Science 172: 440 - 451 (1971)

9. CLEMENS L.E., KELCH R.P., MARKOVS M., WESTHOFF M.H., and DERMODY W.C.
Analysis of the Radioimmunoassay for Gonadotropin-Releasing Hormone (Gn-RH): Studies on the Effect of Radioiodinated Gn-RH
J. Clin. Endocrinol. Metab. 41: 1058 (1975)

10. CZYGAN P.-J. und REICH W.
Der akute Rückkoppelungseffekt exogen zugeführter Oestrogene auf die Serum-Gonadotropinspiegel in der Prä- und Postmenopause
Arch. Gynäk. 215: 17 (1973)

11. CZYGAN P.-J.
Regulationsprinzipien der weiblichen Keimdrüsenfunktion
Fortsch. Geb. Gynäk., Vol. 52, pp. 121 - 198
(Karger, Basel 1974)

12. FRASCHINI F., MOTT M., and MARTINI L.
A 'short' feedback mechanism controlling FSH secretion
Experientia 24: 270 (1968)

13. GEIGER R., KÖNIG W., WISSMANN H., GEISEN K, and ENZMANN F.
Synthesis and characterisation of a decapeptide having LH-RH/FSH-RH activity
Biochem. biophys. Res. Commun. 45: 767 (1971)

14. HALASZ B. and GORSKI R.A.
Gonadotrophic hormone secretion in female rats after partial or total interruption of neural afferents to the medial basal hypothalamus
Endocrinology 80: 608 (1967)

15. HIRONO M., IGARASHI M., and MATSUMOTO S.
Short- and auto-feedback mechanism of LH
Endocrin. jap. 18: 175 (1971)

16. HO Serge
Central Actions of Oestrogenic Hormones
Schering Workshop Berlin October 1974

17. HOHLWEG W. und JUNKMANN K.
Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens
Klin. Wschr. 11: 321 (1932)

18. ISURUGI K. et al.
Age-Related Changes in Serum Luteinizing Hormone (LH) and Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Levels in Normal Men
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39: 955 (1974)

19. JEFFCOATE S.L., FRASER H.M., GUNN A., HOLLAND D.T., WHITE N.
Radioimmunoassay of the Hypothalamic Releasing Hormones, LH-RH and TRH, in Blood and Urine
4th International Congress of Endocrinology, Washington, D.C., 18 - 26 June, 1972

20. JEFFCOATE S.L. et al.
Radioimmunoassay of Luteinizing Hormone-Releasing-Hormone (LH-RH) in Serum from Man, Sheep and Rat
Acta Endocrinologica 75 (1974) 625 - 635

21. JEFFCOATE S.L. et al.
Using Antibodies to Study the Role of LH-RH in Ovulation

22. JONAS Helen A., BURGER Henry G., CUMMING Ian A., FINDLAY John K., and DE KRETSER David M., with the Technical Assistance of Julie ROBINSON
Radioimmunoassay for Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH): Its Application to the Measurement of LHRH in Ovine and Human Plasma
Endocrinology 96: 384 (1975)

23. KASTIN A.J., SCHALLY A.V., GUAL C., MIDGLEY A.R. jr., BOWERS C.Y., and DIAZ-INFANTE A. jr.
Stimulation of LH-release in men and women by LH-releasing hormone purified from porcine hypothalami
J. Clin. Endocrin. 29: 1046 (1969)

24. KUSCHINSKY G. und LÜLLMANN H.
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie
p. 188 (1974)

25. LEYENDECKER G., WARDLAW S., and NOCKE W.
Experimental studies on the endocrine regulations during the periovulatory phase of the human menstrual cycle
Acta endocrin. Kbh. 71: 160 (1972)

26. LEYENDECKER G., WILDT L., and NOCKE W.
Radioimmunoassay of LH-Releasing Hormone
Acta endocrin. (Kbh.) Suppl. 184 (1974) 18

27. MALACARA Juan M., SEYLER, Jr. L. Everett, and REICHLIN Seymour
Luteinizing Hormone Releasing Factor Activity in Peripheral Blood from Women During the Midcycle Luteinizing Hormone Ovulatory Surge
J. Clin. Endocr. 34: 271 (1972)

28. MATSUO H., BABA Y., NAIR R.M.G., ARIMURA A., and SCHALLY A.V.
Structure of the Porcine LH- and FSH-Releasing Hormone I. The Proposed Amino Acid Sequence
Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 43, No. 6, 1971

29. MATSUO Hisayuki, ARIMURA Akira, NAIR R.M.G., and SCHALLY Andrew V.
Synthesis of the Porcine LH- and FSH-Releasing Hormone by the Solid-Phase Method
Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 45, No. 3, 1971

30. MILLER Myron and MOSES Arnold M.
Radioimmunoassay of Vasopressin with a Comparison of Immunological and Biological Activity in the Rat Posterior Pituitary
Endocrinology 84: 557 (1969)

31. MIYACHI Yukitaka, CHRAMBACH Andreas, MECKLENBURG Robert, and LIPSETT Mortimer B.
Enzymatic Radioiodination of Gonadotropins
J. Clin. Endocrinol. Metab. 34: 23 (1972)

32. MONTOYA Eladio, SEIBEL Mary Jo, and WILBER John F.
Thyrotropin-Releasing Hormone Secretory Physiology: Studies by Radioimmunoassay and Affinity Chromatography
Endocrinology 96: 1413 (1975)

33. NEILL J.D., DAILEY R.A., TSOU R.C., PATTON J., and TINDALL G.
Control of the Ovarian Cycle in the Monkey

34. NETT T.M., AKBAR A.M., NISWENDER G.D., HEDLUND M.T., and WHITE W.F.
A Radioimmunoassay for Gonadotropin-Releasing Hormone (Gn-RH) in Serum
J. Clin. Endocrinol. Metab. 36: 880 (1973)

35. NILLIUS S.J., and WIDE L.
Induction of a midcycle-like peak of luteinizing hormone in young women by exogenous oestradiol-17 ß
J. Obstet. Gynaec. brit. Cwlth 78: 822 (1971)

36. NILLIUS S.J., and WIDE L.
Effect of oestrogen on serum levels of FSH and LH in postmenopausal women treated with oestrogen
Acta endocrin., Kbh. 67: 362 (1971)

37. NISWENDER G.D., and REES MIDGLEY Jr. A.
Hapten-Radioimmunoassay for Steroid Hormones
Immunological Methods in Steroid Determination
Meredith Corp., New York, 1970, p. 149

38. NISWENDER G.D. et al.
Radioimmunoassay for Bovine and Ovine Luteinizing Hormone
Endocrinology 84: 1166 (1969)

39. OLIVER C. et al.
Radioimmunoassay of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) in Human Plasma and Urine
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39: 406 (1974)

40. PARKE-DAVIS
Radioimmunoassay for LRF

41. REDDING T.W., KASTIN A.J., GONZALEZ-BARCENA D., COY D.H., COY E.J., SCHALCH D.S., and SCHALLY A.V.
The Half-life, Metabolism and Excretion of Tritiated Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in Man
J. Clin. Endocrinol. Metab. 37: 626 (1973)

42. ROSS G.T., CARGILLE C.M., LIPSETT M.B., RAYFORD P.L., MARSHALL J.R., STROTT C.A., and RODBARD D.
Pituitary and gonadal hormones in women during spontaneous and induced ovulatory cycles
Recent Progr. Hormone Res. 26: 1 (1970)

43. SANDOW J., ENZMANN F., ARIMURA A., REDDING T.W., and SCHALLY A.V.
Purification and Characterisation of two Porcine Hypothalamic Fractions with LH-Releasing Activity: Evidence for a Single LH and FSH-Releasing Hormone
Hoechst AG., Frankfurt (Main), W.Germany and V.A. Hospital and Tulane University, School of Medicine, New Orleans, USA

44. SAXENA
Iodination of Synthetic LRF
New England Nuclear

45. SCHALLY A.V., ARIMURA A., BOWERS C.Y., KASTINA J., SAWANO S., and REDDING T.W.
Hypothalamic Neurohormones Regulating Anterior Pituitary Function
Recent Progr. Horm. Res. 24: 497 (1968)

46. SCHALLY A.V., ARIMURA A., BOWERS C.Y., WAKABAYASHI J., NAIR A.J.G., PIZZOLATO P., and SEGAL A.J.
Releasing Factors in Human Hypothalamic and Neurohypophysial Extracts
J. Clin. Endocrinol. Metab. 27: 755 (1967)

47. SCHALLY Andrew V., KASTIN Abba J., and ARIMURA Akira
The Hypothalamus and Reproduction
American Journal of Obstetrics and Gynaecology
Vol. 122, No. 7, 1975

48. SCHALLY A.V., KASTIN A.J., and ARIMURA A.
Hypothalamic follicle-stimulating (FSH) and luteinizing hormone (LH)-regulating hormone: structure, physiology, and clinical studies
Fertil. Steril. 22: 703 (1971)

49. SCHNEIDER H.P.G., and McCANN S.M.
Estradiol and the neuroendocrine control of LH release in vitro
Endocrinology 87: 330 (1970)

50. SEYLER Jr. L.E., and REICHLIN S.
Episodic Secretion of Luteinizing Hormone-Releasing Factor (LRF) in the Human
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39: 471 (1974)

51. SEYLER Jr. L.E., and REICHLIN S.
Feedback Regulation of Circulating LRF Concentrations in Men
J. Clin. Endocrinol. Metab. 39: 906 (1974)

52. SHIN Seon H., and KRAICER Jacob
LH-RH Radioimmunoassay and its Applications: Evidence of Antigenically Distinct FSH-RH and a Diurnal Study of LH-RH and Gonadotropins
Life Sciences Vol. 14, pp. 281 - 288 (1974)

53. SZENTAGOTHAI J.
Schaltmechanismus der hypothalamo-hypophysären Steuerung
Verl. dtsch. Ges. inn. Med., p. 42
(Bergmann, München 1965)

54. VANDE WIELE R.L., BOGUMIL J., DYRENFURTH I., FERIN M., JEWELEWICZ R., WARREN M., RIZKALLAH T., and MIKHAIL G.
Mechanisms regulating the menstrual cycle in women
Recent Progr. Hormone Res. 26: 63 (1970)

55. VIRKKUNEN Pekka, LYBECK Harry, PARTANEN Juhani, RANTA Tapio, LEPPÄLUOTO Juhani, and SEPPÄLÄ Markku Plasma Disappearance of Injected Synthetic LRH in Man as Measured by Bioassay and Radioimmunoassay J. Clin. Endocrinol. Metab. 39: 630 (1974)

Die vorliegende Arbeit entstand im Hormonlabor der Frauen- und Poliklinik der Freien Universität Berlin - Charlottenburg.

Der Verfasser dankt allen Beteiligten, die mit ihrer Unterstützung zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben; insbesondere Herrn Professor Dr. med. J. Nevinny-Stickel und Herrn Dr. med. M. Schmidt-Gollwitzer für ihre stete Hilfe und wertvollen Anregungen.

Mein Dank gilt ebenso den Assistentinnen des Hormonlabors, den Damen U. Schmitt, C. Kaegler und G. Tiedemann, die mir bei der Einführung in die praktische Laborarbeit und bei der Bestimmung der Steroid- und Proteohormone behilflich waren, sowie Herrn Dr. Pollow vom Institut für Biochemie der Freien Universität Berlin für seine tatkräftige Mitarbeit bei der Ausarbeitung und Durchführung der Sephadex-Chromatographie und der isoelektrischen Fokussierung.

Lebenslauf

Name:	Bernd M e t s c h e r	
geboren:	15.1.1952 in Berlin	
Schule:	1958-1964 Grundschule in Berlin - Zehlendorf 1964-1971 Gymnasium in Berlin - Zehlendorf Januar 1971 Reifeprüfung	
Studium:	SS 1971	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
	März 1972	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
	September 1973	Ärztliche Vorprüfung
	1974	Beginn der Dissertationsarbeit
	1977	Medizinisches Staatsexamen
Derzeitige Tätigkeit:	Medizinalassistent am Städtischen Krankenhaus Berlin - Moabit	

DIENCEPHALON

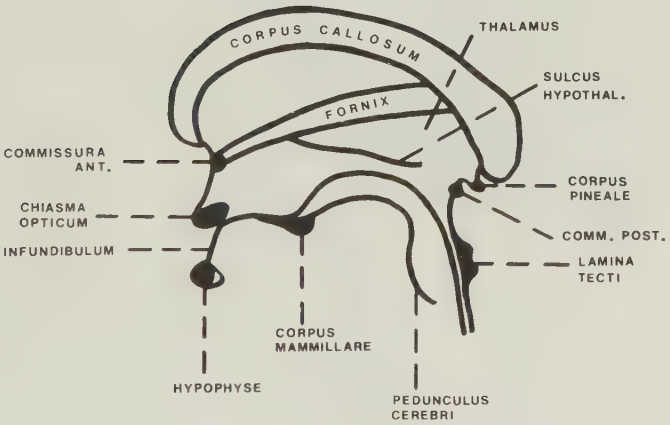
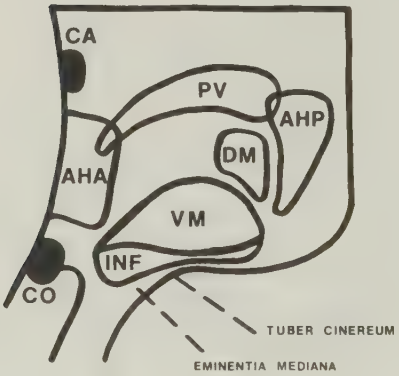


Fig. 1 Diencephalon

HYPOTHALAMUS



CA	=	COMMISSURA ANT.
AHA	=	AREA HYPOTHAL. ANT.
PV	=	NUCL. PARAVENTRICUL.
AHP	=	AREA HYPOTHAL. POST.
DM	=	NUCL. DORSOMED.
VM	=	NUCL. VENTROMED. } NUCL. ARCUATUS
INF	=	NUCL. INFUNDIBUL. } NUCL. ARCUATUS

VERBINDUNG
HYPOTHALAMUS – HYPOPHYSE

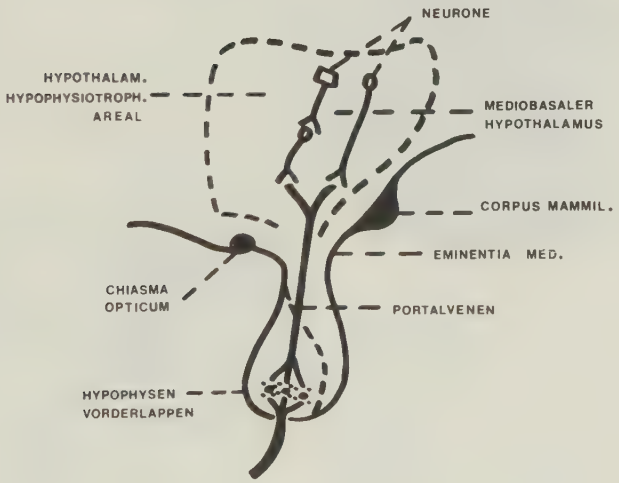


Fig. 3

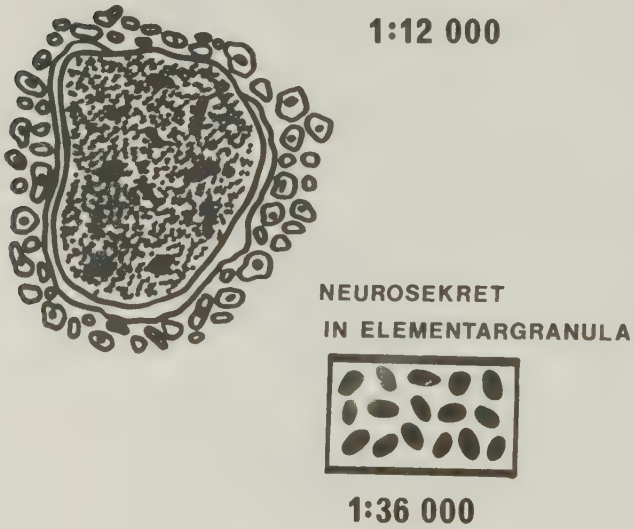


Fig. 4 Ausschnitt aus dem Tr. tubero-infundibularis (Neurosekret)

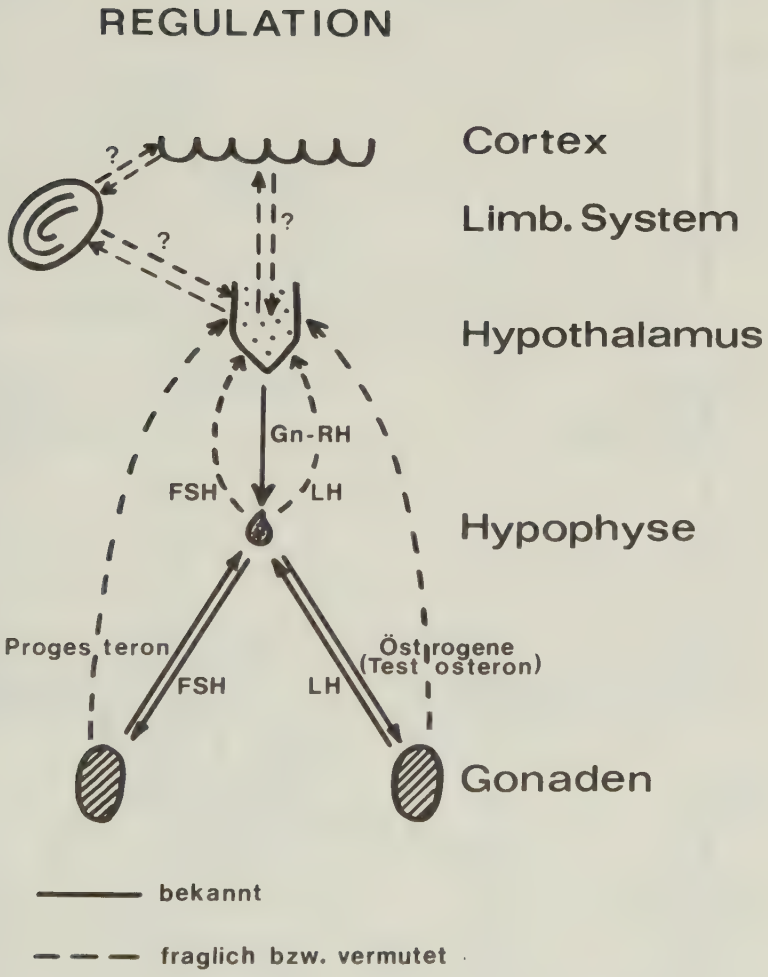


Fig. 5 Hypothalamisch-Hypophysäre (corticale und subcorticale) Regulation beim Menschen

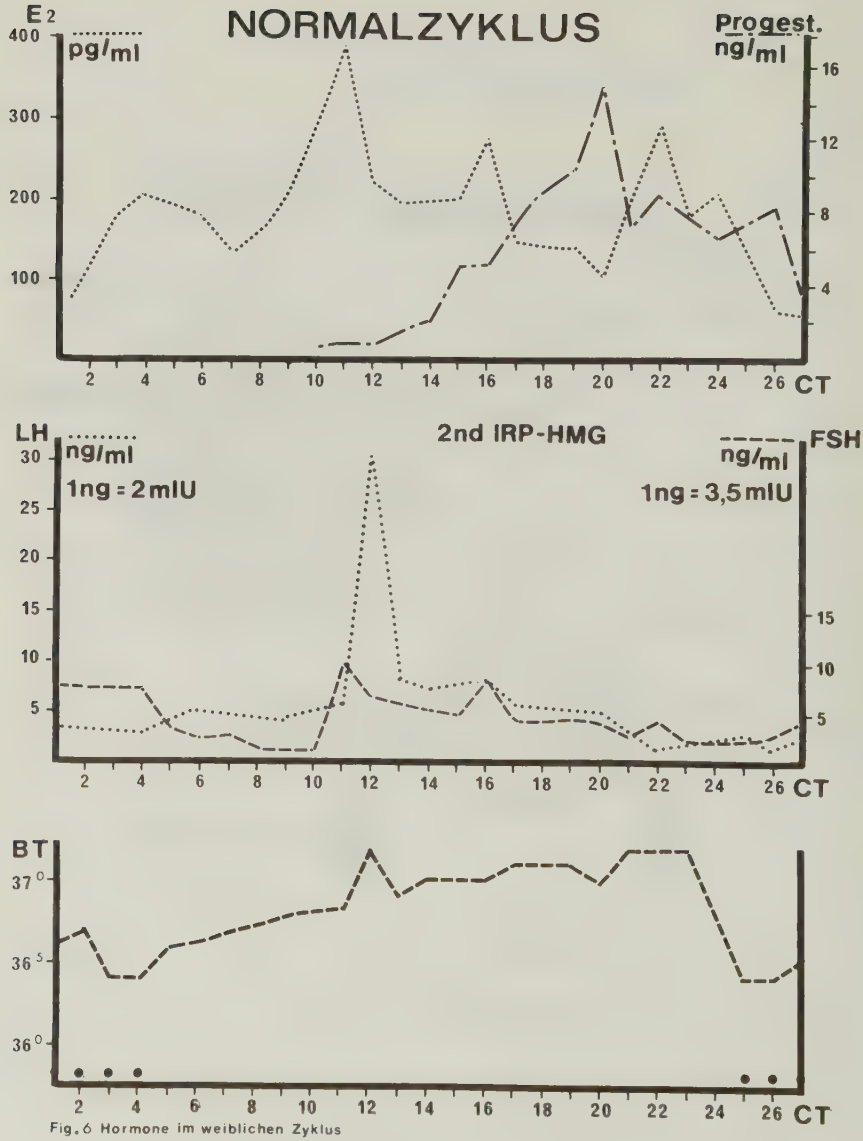
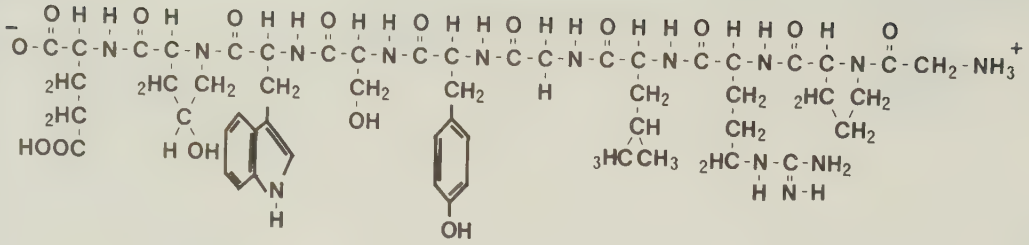


Fig. 6 Hormone im weiblichen Zyklus

Gn-RH

MOLEKÜLAUFBAU



$^{-}$Glu — His — Trp — Ser — Tyr — Gly — Leu — Arg — Pro — Gly^{+}

Fig. 7

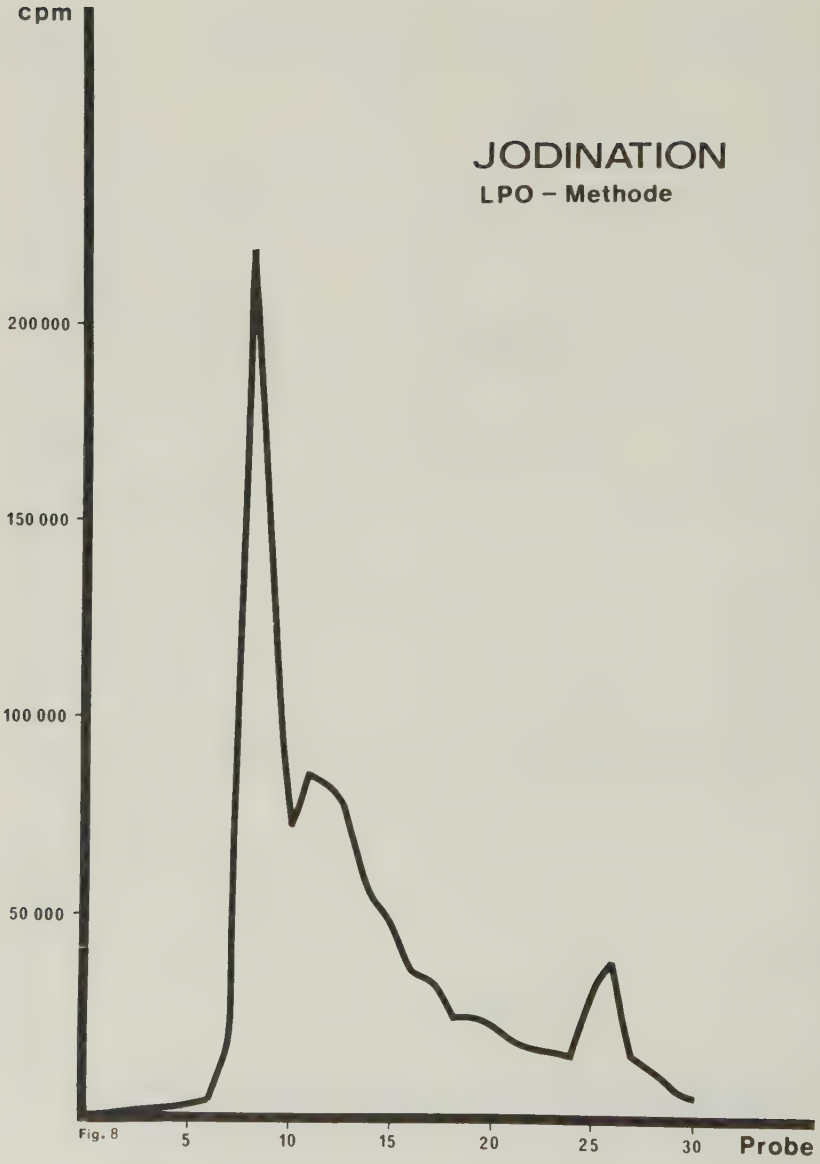

cpm
JODINATION
LPO – Methode
200 000
150 000
100 000
50 000
5
10
15
20
25
30
Probe

Fig. 8

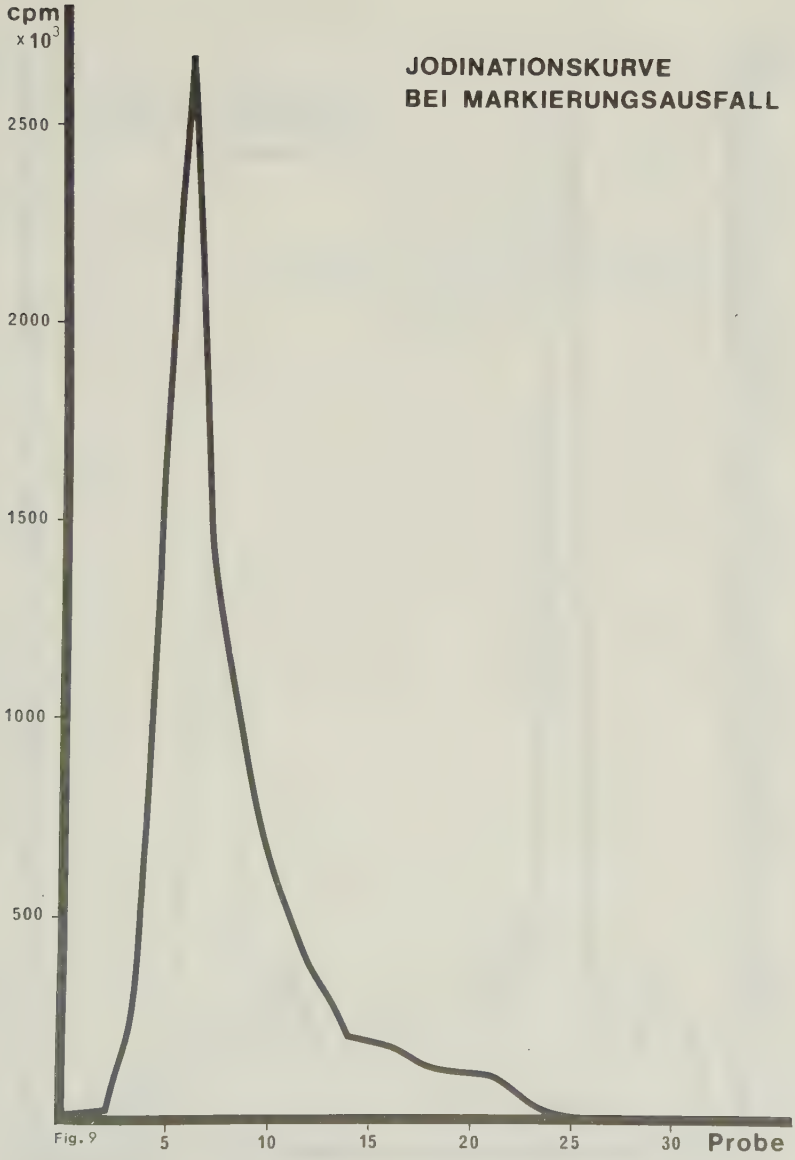

cpm
x 10³
2500
2000
1500
1000
500
JODINATIONSKURVE
BEI MARKIERUNGSAUSFALL
5
10
15
20
25
30
Probe

Fig. 9

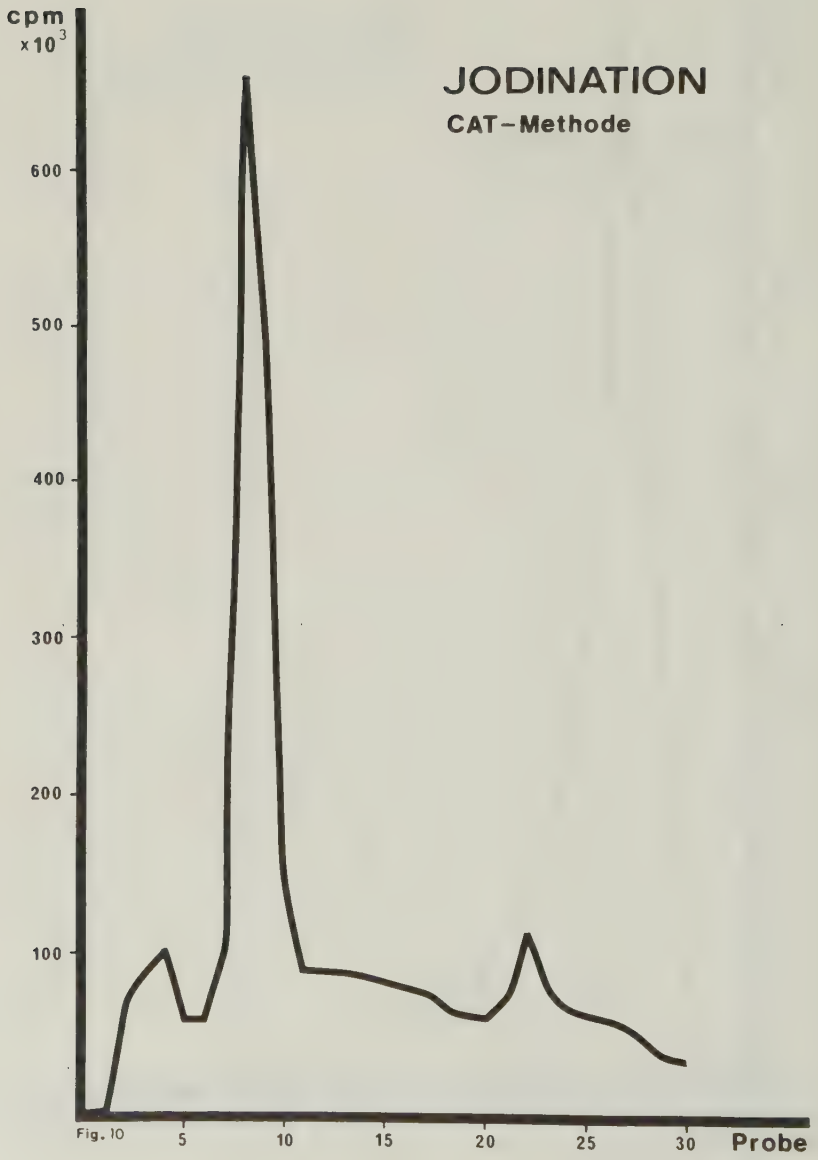

cpm
x10³
600
500
400
300
200
100
JODINATION
CAT-Methode
5
10
15
20
25
30
Probe

Fig. 10

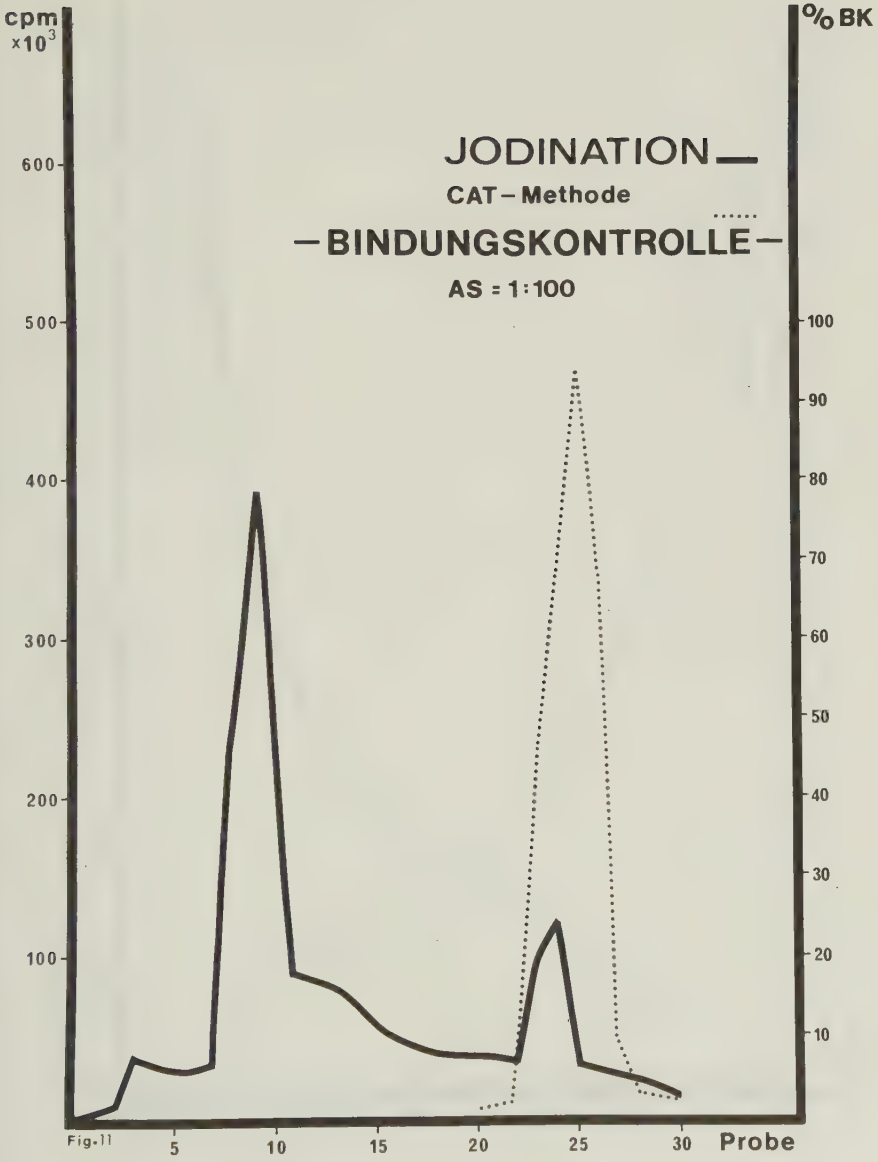

cpm
x10³
% BK
JODINATION
CAT – Methode
– BINDUNGSKONTROLLE –
AS = 1:100
600
500
400
300
200
100
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
10
15
20
25
30
Probe

Fig.11

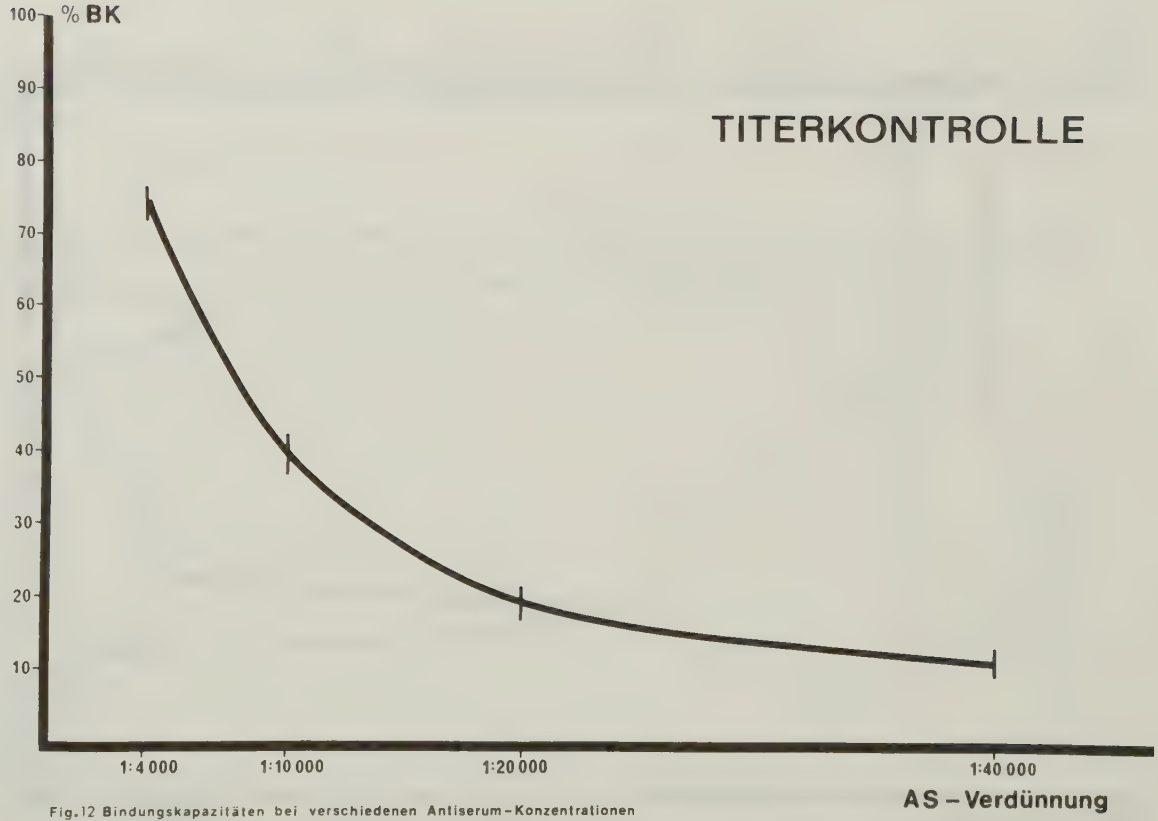


Fig.12 Bindungskapazitäten bei verschiedenen Antiserum-Konzentrationen

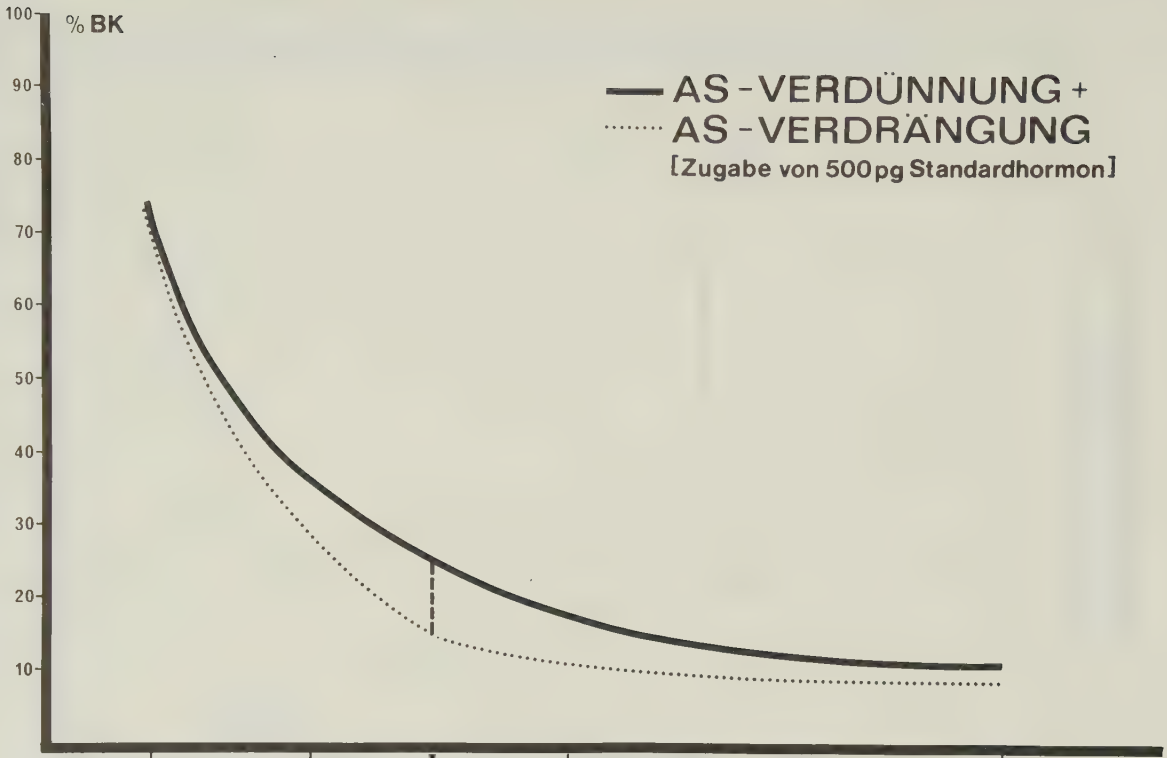


Fig. 13 Feststellung der optimalen Antiserum-Konzentration

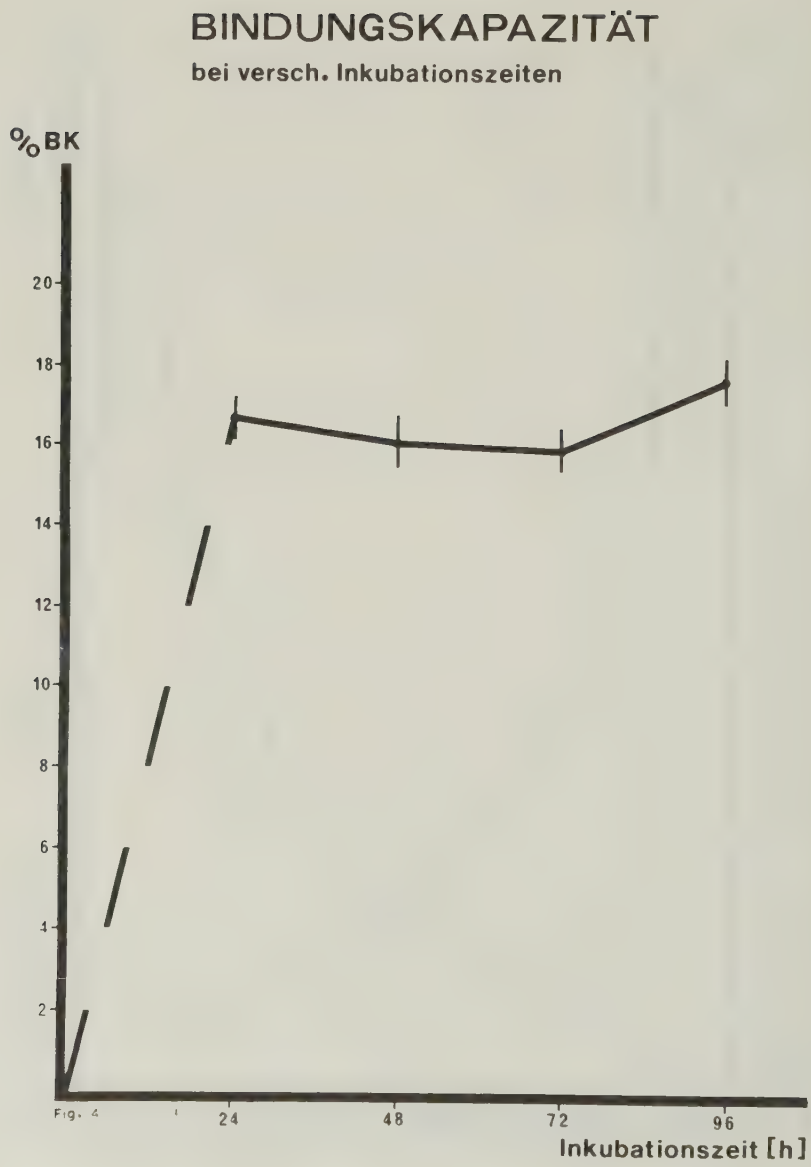

BINDUNGSKAPAZITÄT
bei versch. Inkubationszeiten
%BK
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
24
48
72
96
Inkubationszeit [h]

Fig. 4

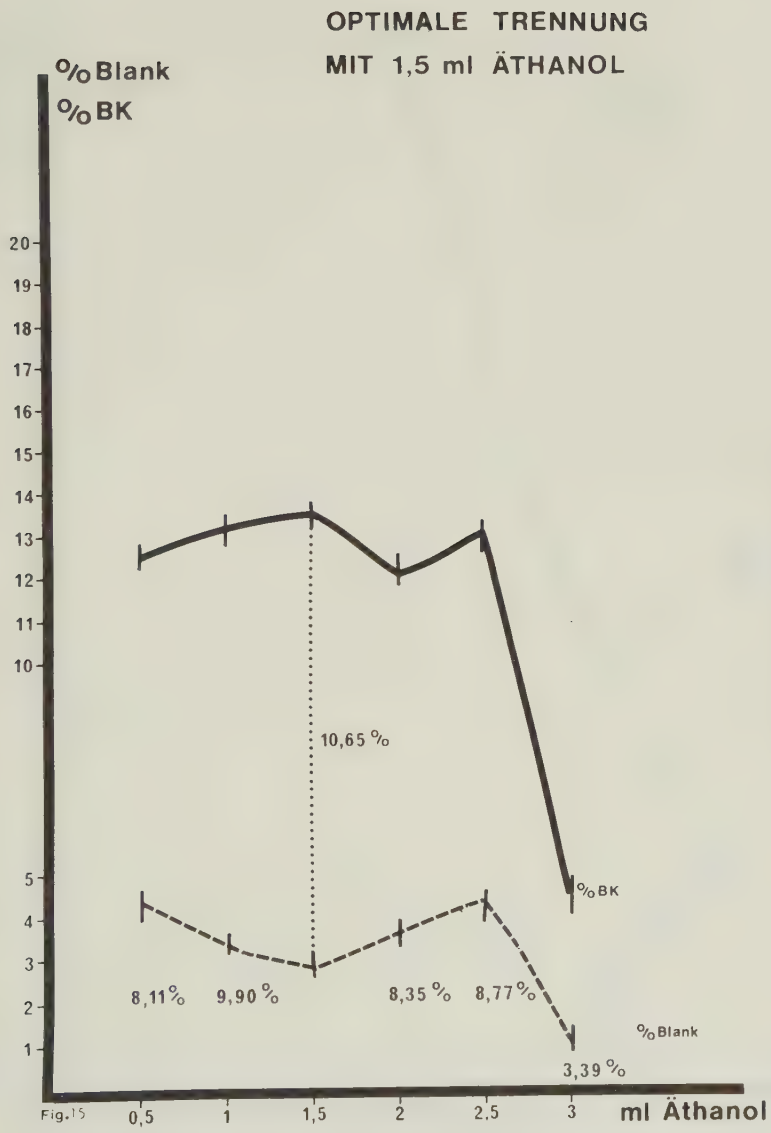

OPTIMALE TRENNUNG
MIT 1,5 ml ÄTHANOL
% Blank
% BK
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
5
4
3
2
1
10,65 %
% BK
8,11 %
9,90 %
8,35 %
8,77 %
% Blank
3,39 %
0,5
1
1,5
2
2,5
3
ml Äthanol

Fig.15

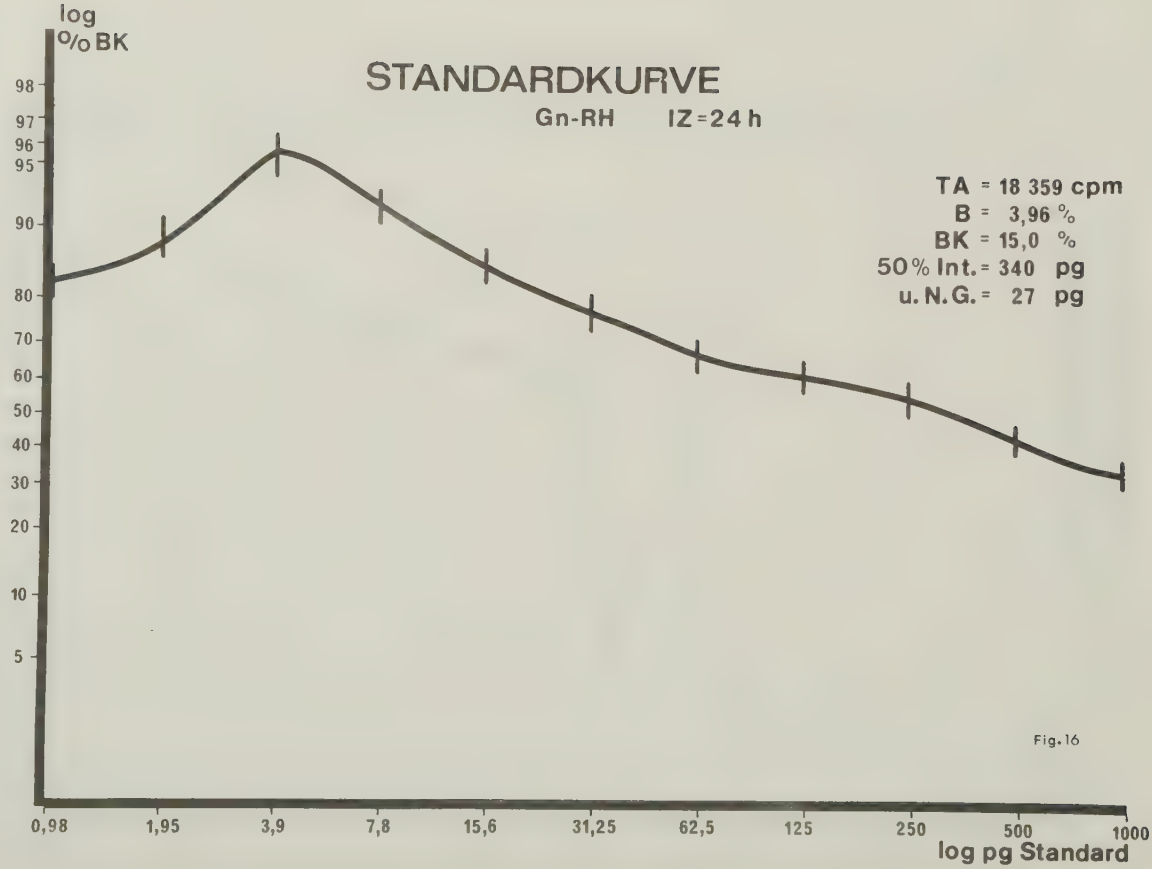

log
% BK
STANDARDKURVE
Gn-RH IZ=24 h
TA = 18 359 cpm
B = 3,96 %
BK = 15,0 %
50 % Int. = 340 pg
u. N. G. = 27 pg
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
62,5
125
250
500
1000
log pg Standard

Fig. 16

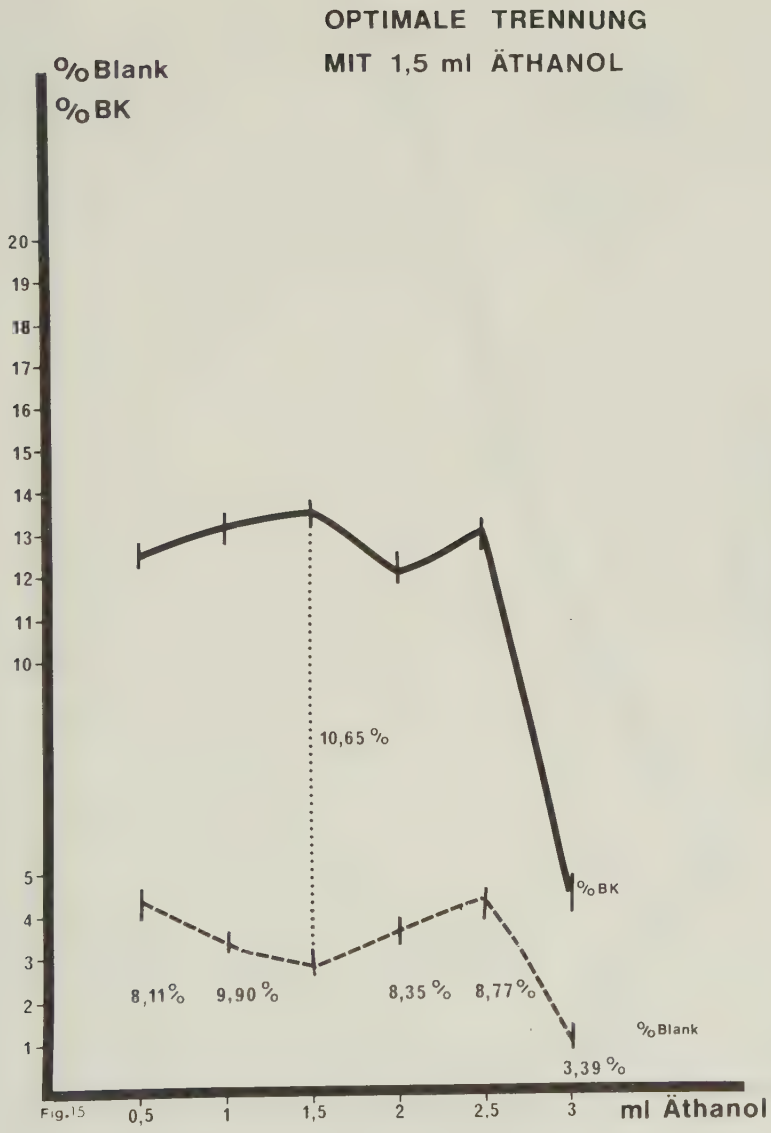

OPTIMALE TRENNUNG
MIT 1,5 ml ÄTHANOL
% Blank
% BK
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
5
4
3
2
1
10,65 %
% BK
8,11 %
9,90 %
8,35 %
8,77 %
% Blank
3,39 %
0,5
1
1,5
2
2,5
3
ml Äthanol

Fig.15

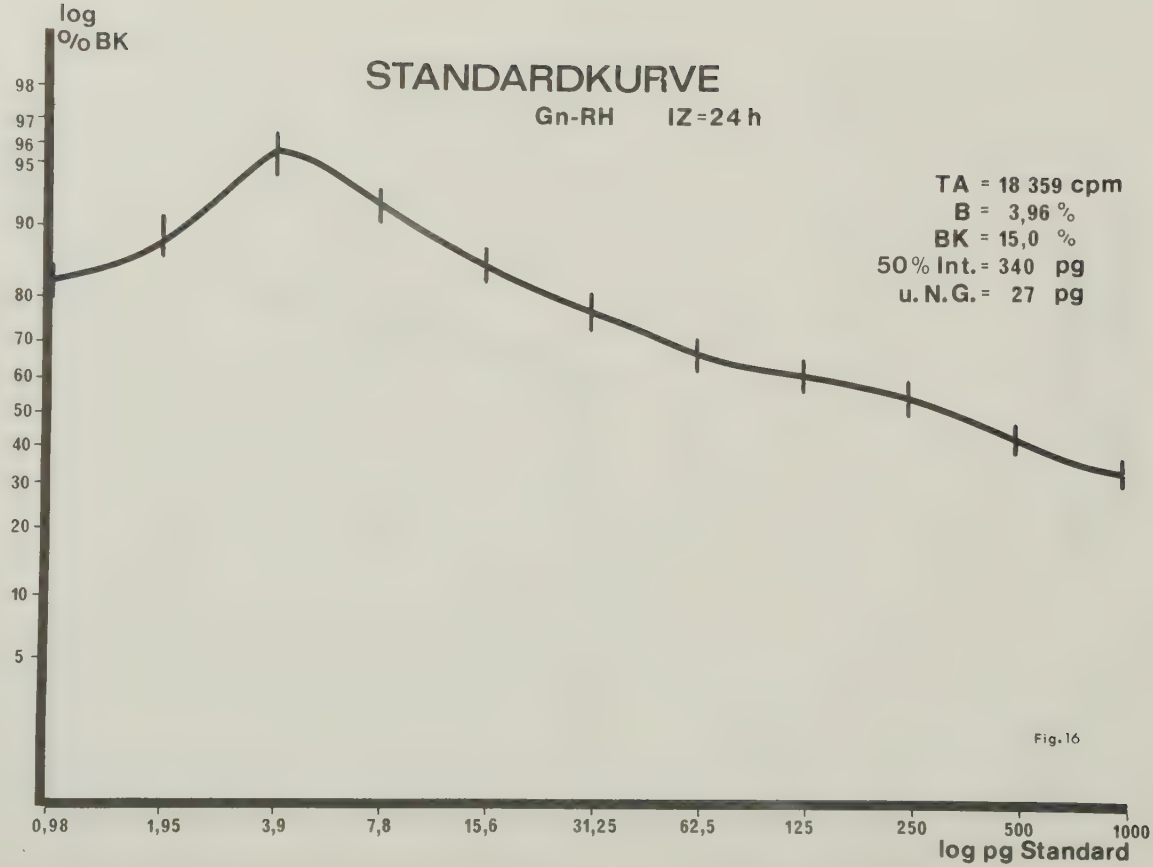

log
% BK
STANDARDKURVE
Gn-RH IZ=24 h
TA = 18 359 cpm
B = 3,96 %
BK = 15,0 %
50 % Int. = 340 pg
u. N. G. = 27 pg
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
62,5
125
250
500
1000
log pg Standard

Fig. 16

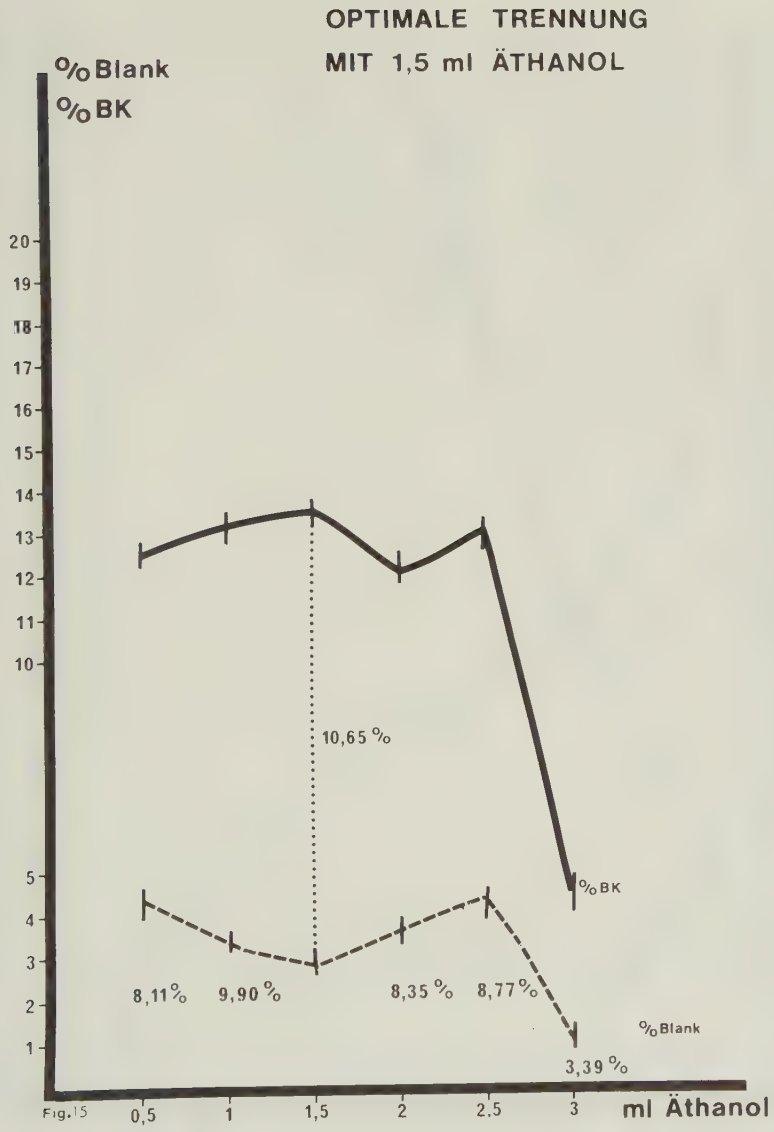

OPTIMALE TRENNUNG
MIT 1,5 ml ÄTHANOL
% Blank
% BK
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
5
4
3
2
1
10,65 %
% BK
8,11 %
9,90 %
8,35 %
8,77 %
% Blank
3,39 %
0,5
1
1,5
2
2,5
3
ml Äthanol

Fig.15

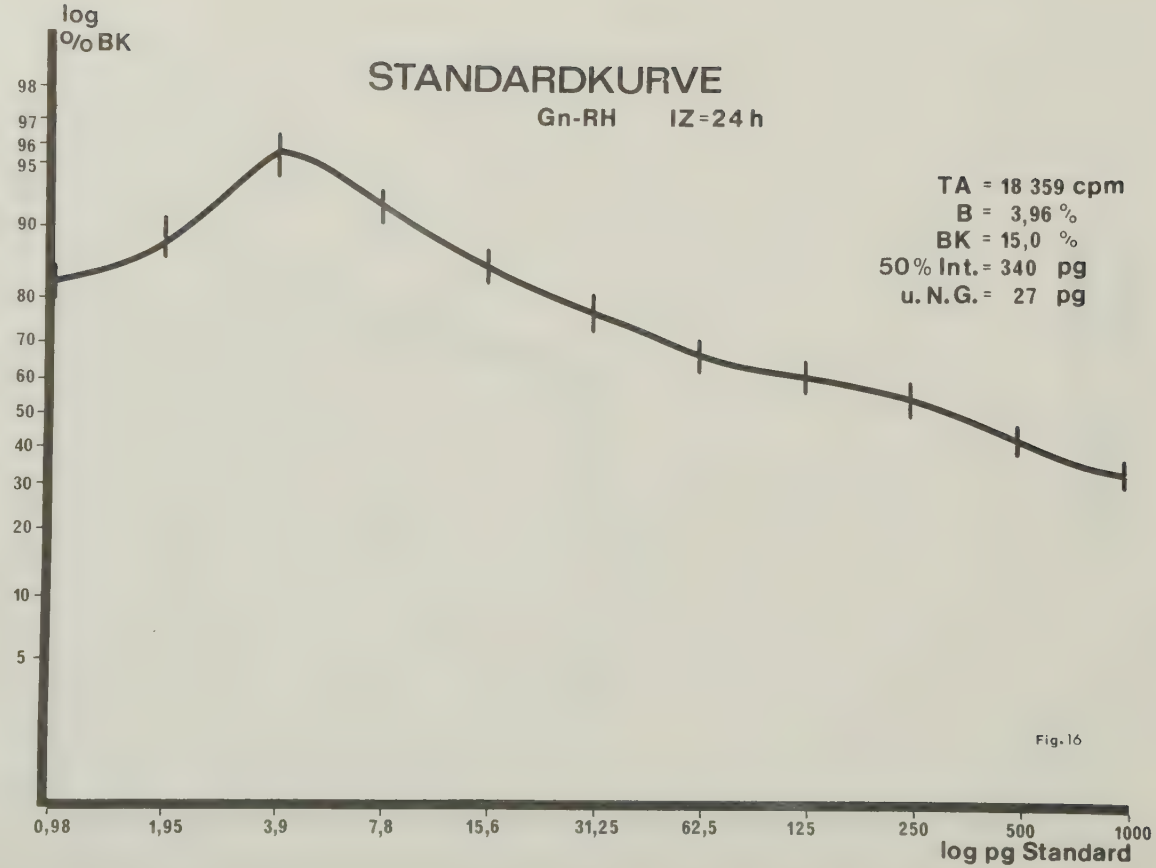

log
% BK
STANDARDKURVE
Gn-RH IZ=24 h
TA = 18 359 cpm
B = 3,96 %
BK = 15,0 %
50% Int. = 340 pg
u. N. G. = 27 pg
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
62,5
125
250
500
1000
log pg Standard

Fig. 16

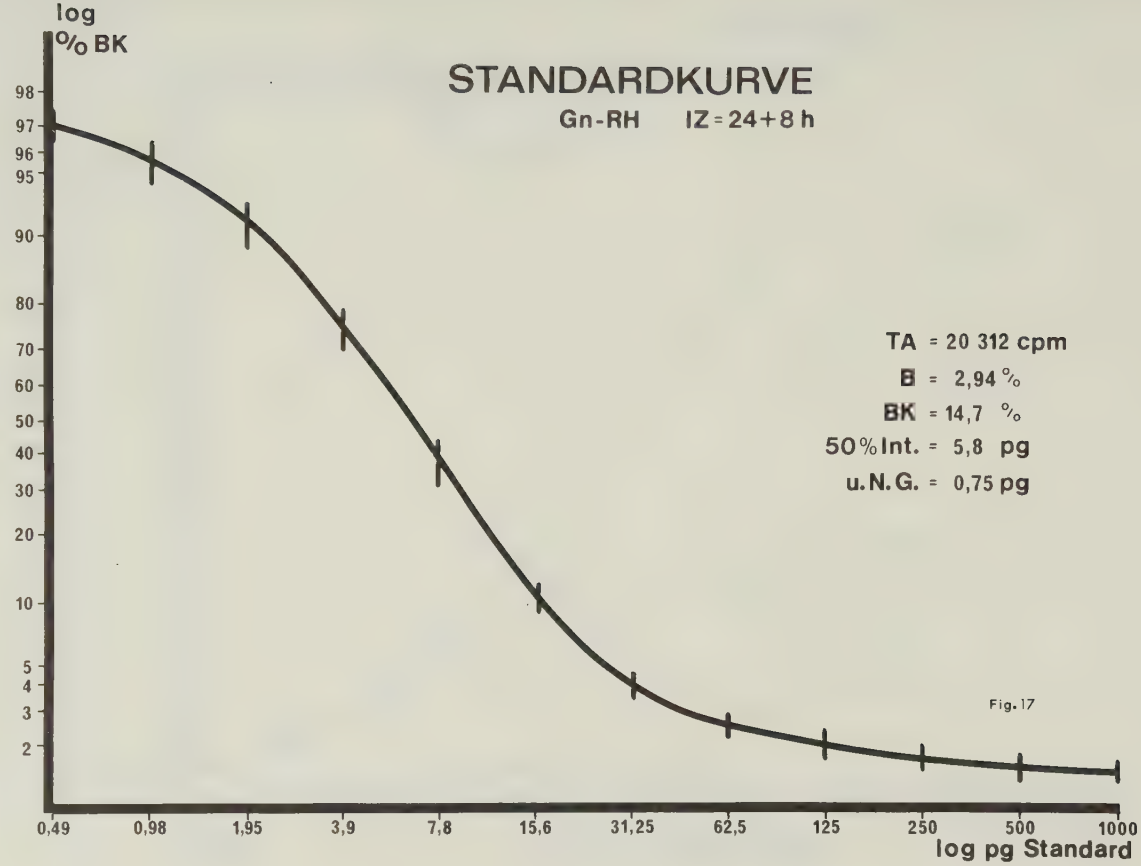

log
% BK
STANDARDKURVE
Gn-RH IZ = 24+8 h
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
4
3
2
TA = 20 312 cpm
B = 2,94 %
BK = 14,7 %
50 % Int. = 5,8 pg
u.N.G. = 0,75 pg
0,49
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
62,5
125
250
500
1000
log pg Standard

Fig. 17

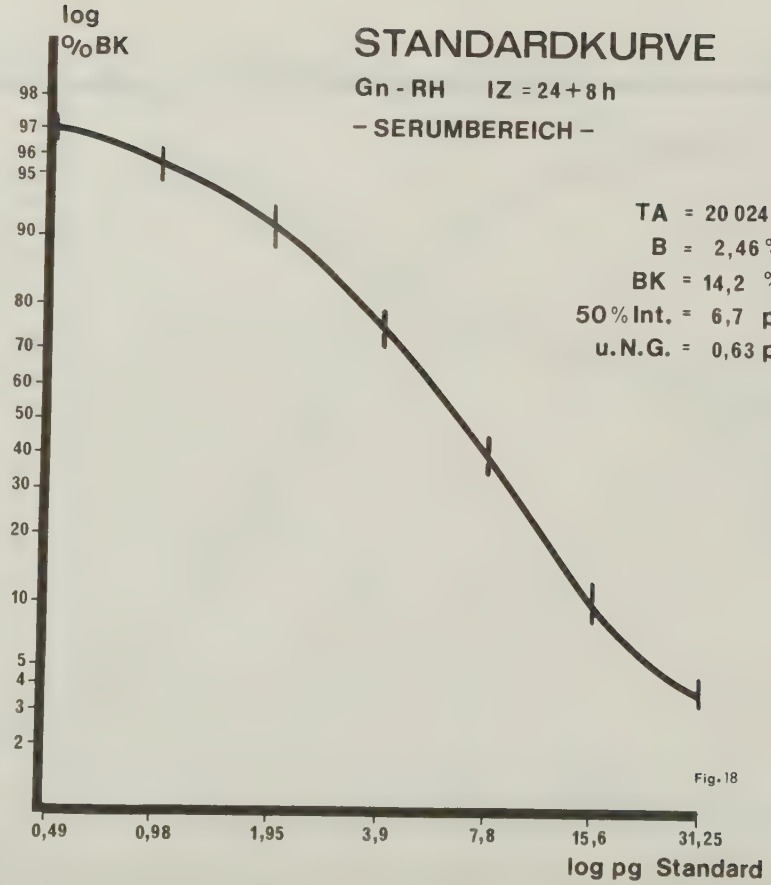

log
%BK
STANDARDKURVE
Gn - RH IZ = 24 + 8 h
– SERUMBEREICH –
TA = 20 024 cpm
B = 2,46 %
BK = 14,2 %
50 % Int. = 6,7 pg
u.N.G. = 0,63 pg
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
4
3
2
0,49
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
log pg Standard

Fig. 18

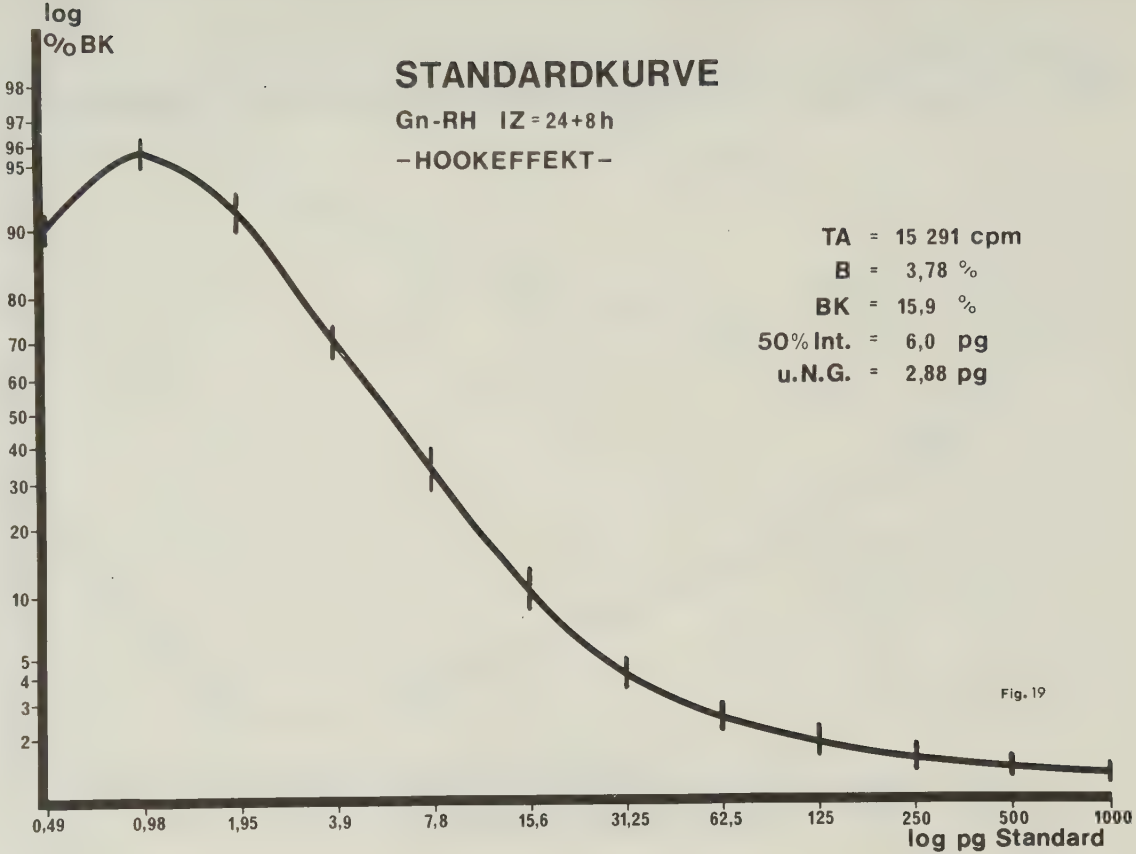

log
%BK
STANDARDKURVE
Gn-RH IZ = 24+8h
-HOOKEFFEKT-
TA = 15 291 cpm
B = 3,78 %
BK = 15,9 %
50% Int. = 6,0 pg
u.N.G. = 2,88 pg
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
4
3
2
0,49
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
62,5
125
250
500
1000
log pg Standard

Fig. 19

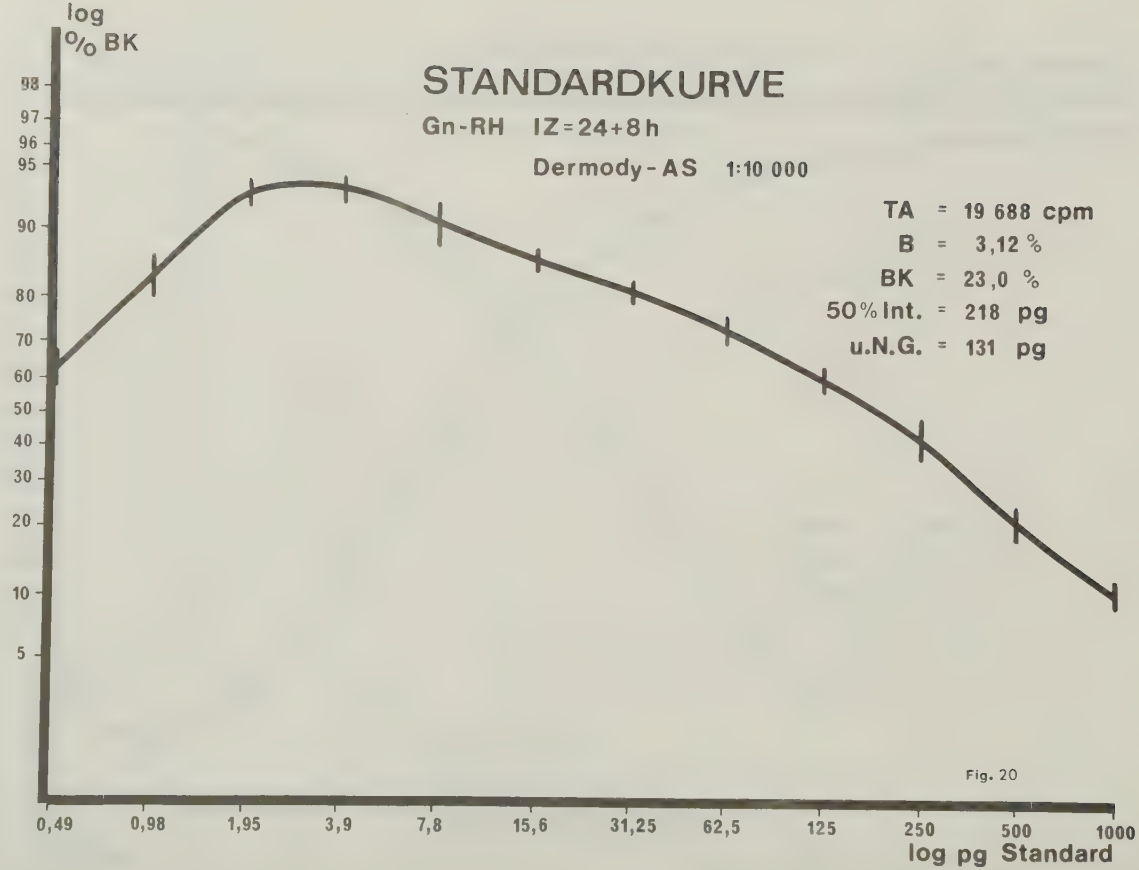

log
% BK
STANDARDKURVE
Gn-RH IZ=24+8h
Dermody-AS 1:10 000
TA = 19 688 cpm
B = 3,12 %
BK = 23,0 %
50% Int. = 218 pg
u.N.G. = 131 pg
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
0,49
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
62,5
125
250
500
1000
log pg Standard

Fig. 20

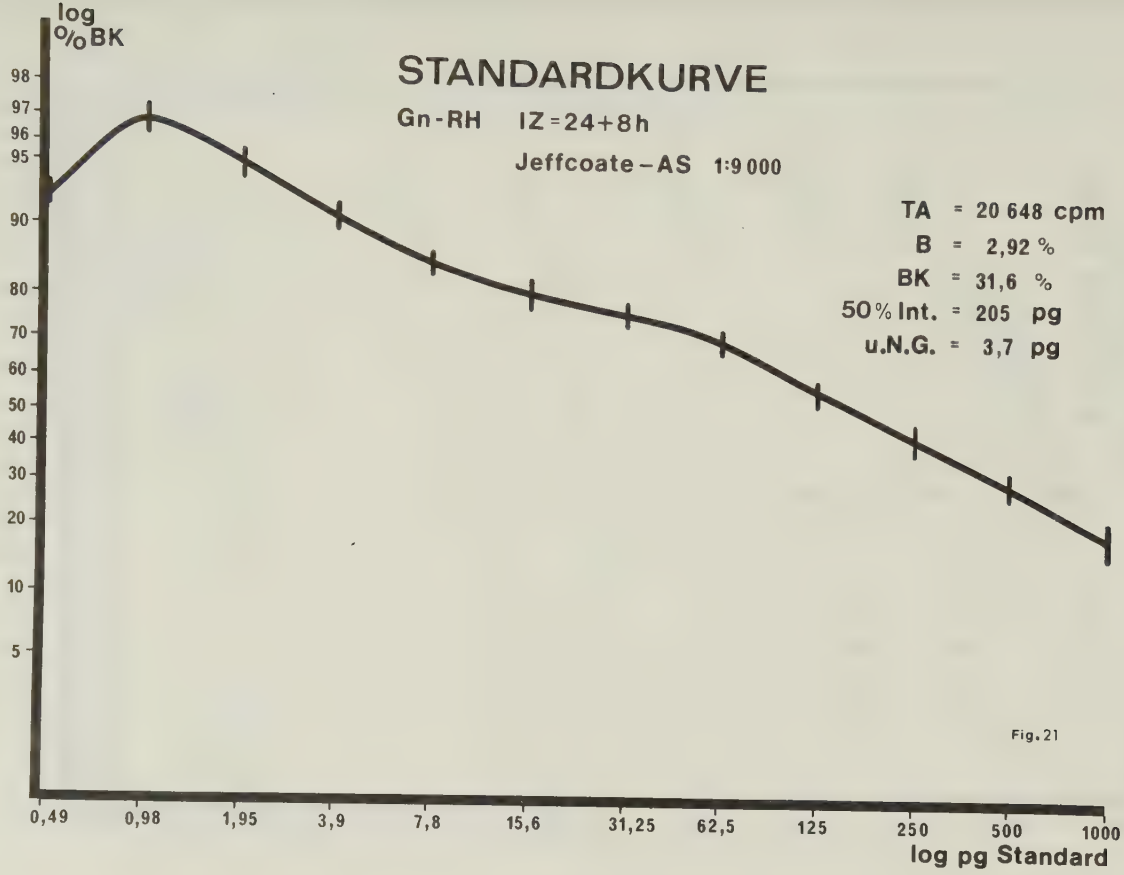

log
%BK
STANDARDKURVE
Gn-RH IZ=24+8h
Jeffcoate-AS 1:9000
TA = 20 648 cpm
B = 2,92 %
BK = 31,6 %
50% Int. = 205 pg
u.N.G. = 3,7 pg
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
0,49
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
62,5
125
250
500
1000
log pg Standard

Fig. 21

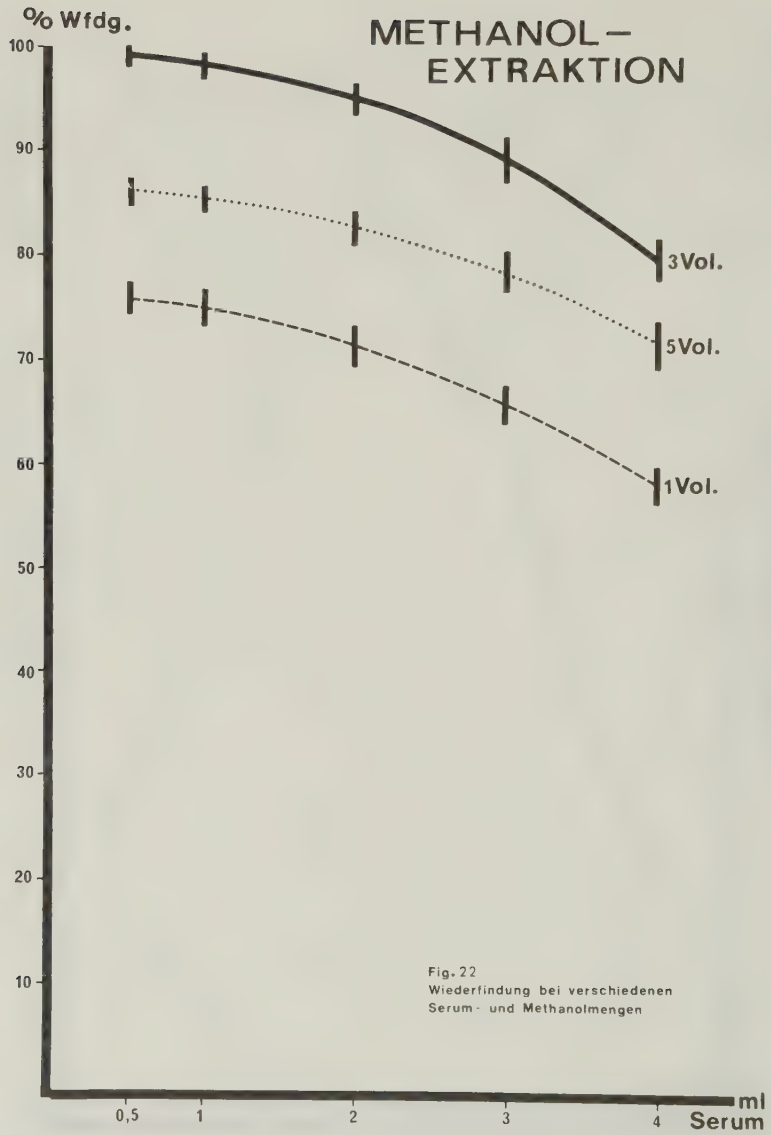


Fig. 22
Wiederfindung bei verschiedenen
Serum- und Methanolmengen

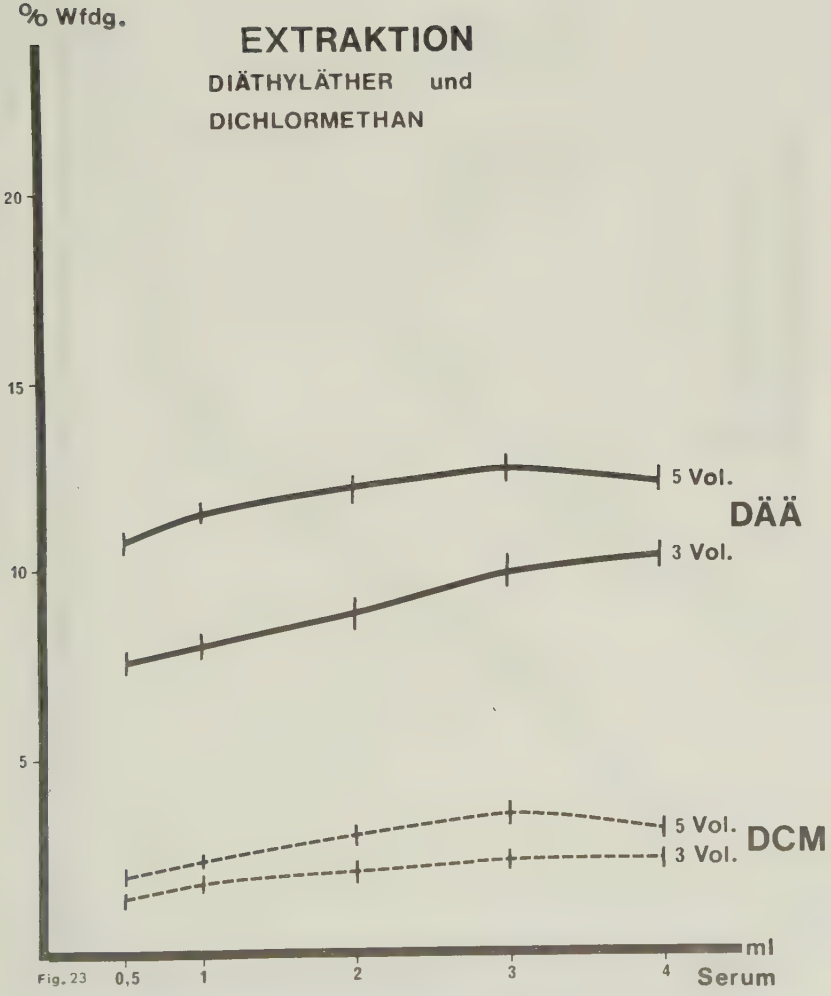
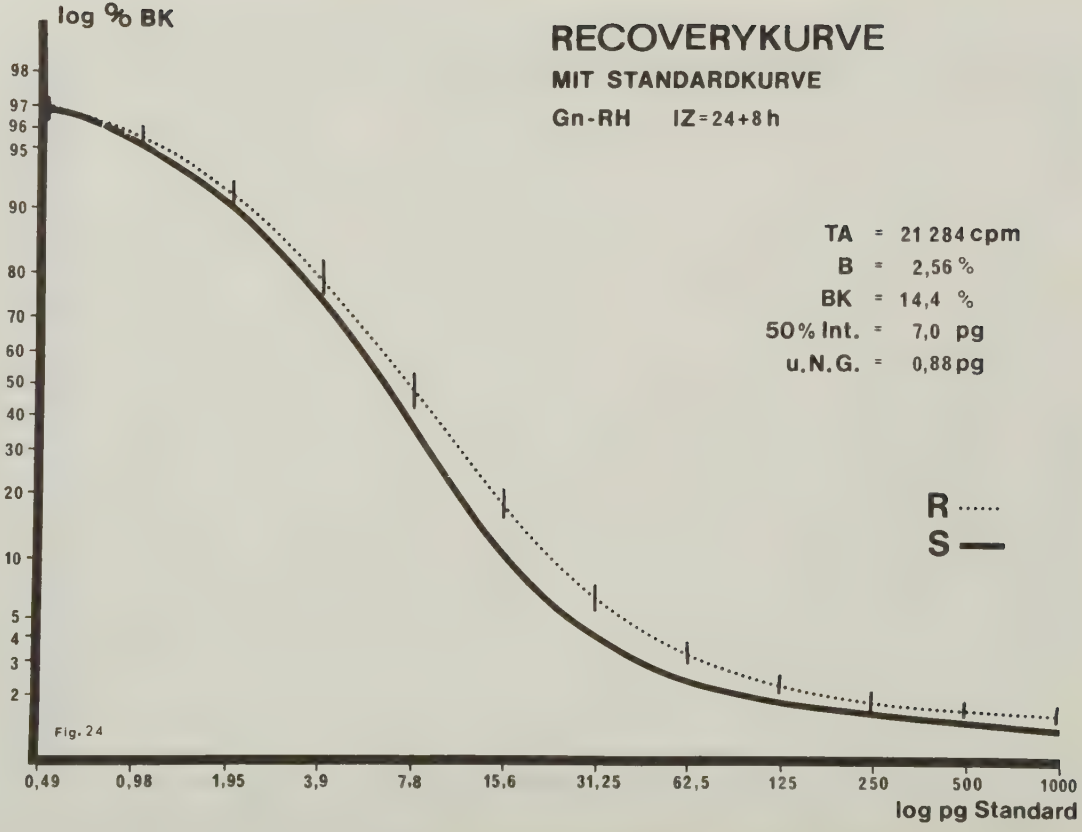

% Wfdg.
EXTRAKTION
DIÄTHYLÄTHER und
DICHLORMETHAN
20
15
10
5
5 Vol.
DÄÄ
3 Vol.
5 Vol.
3 Vol.
DCM
ml
0,5
1
2
3
4
Serum

Fig. 23


log % BK
RECOVERYKURVE
MIT STANDARDKURVE
Gn-RH IZ=24+8 h
TA = 21 284 cpm
B = 2,56 %
BK = 14,4 %
50% Int. = 7,0 pg
u.N.G. = 0,88 pg
R
S
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
4
3
2
0,49
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
62,5
125
250
500
1000
log pg Standard
Fig. 24

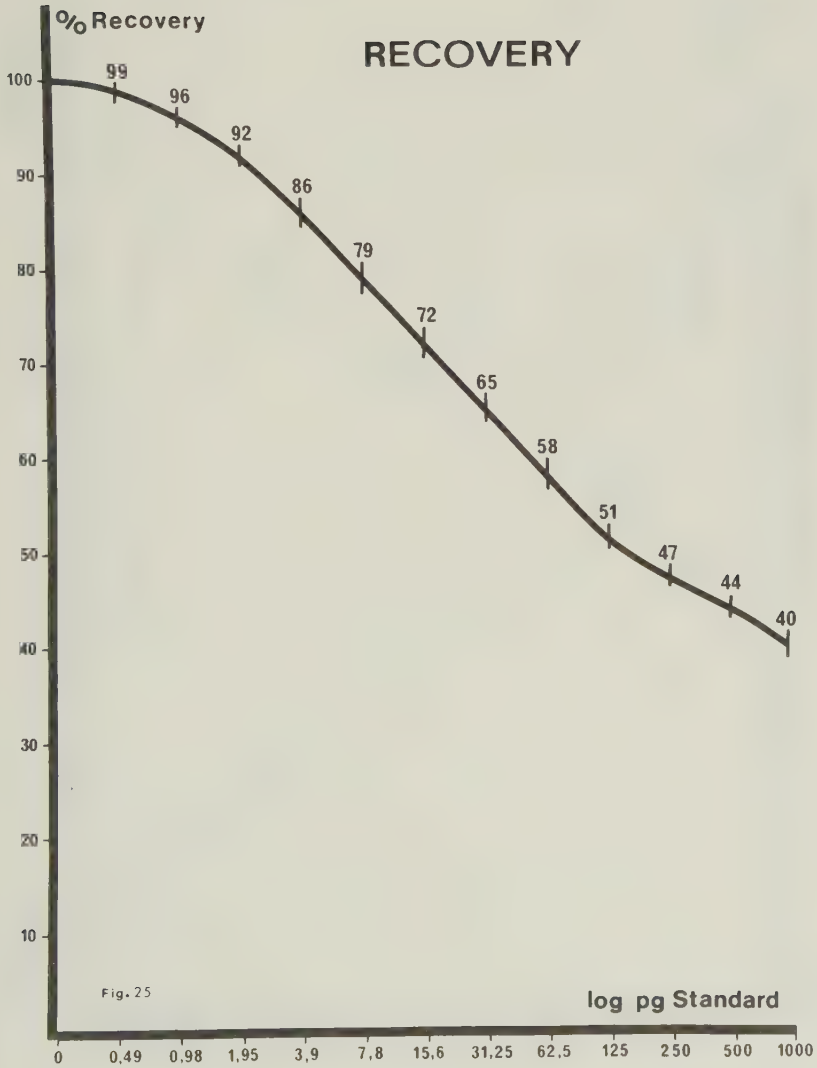

% Recovery
RECOVERY
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
99
96
92
86
79
72
65
58
51
47
44
40
0
0,49
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
62,5
125
250
500
1000
log pg Standard

Fig. 25

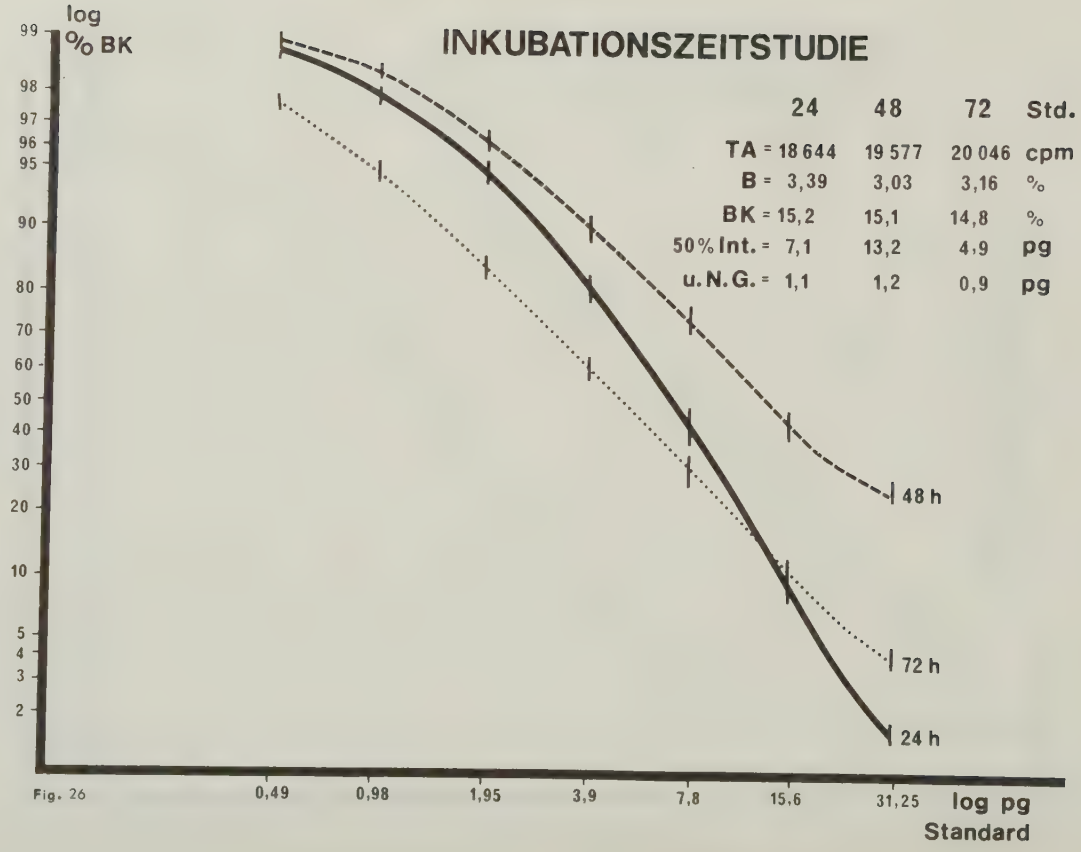

log
% BK
INKUBATIONSZEITSTUDIE
24 48 72 Std.
TA = 18 644 19 577 20 046 cpm
B = 3,39 3,03 3,16 %
BK = 15,2 15,1 14,8 %
50 % Int. = 7,1 13,2 4,9 pg
u. N. G. = 1,1 1,2 0,9 pg
99
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
4
3
2
48 h
72 h
24 h
0,49
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
log pg
Standard

Fig. 26

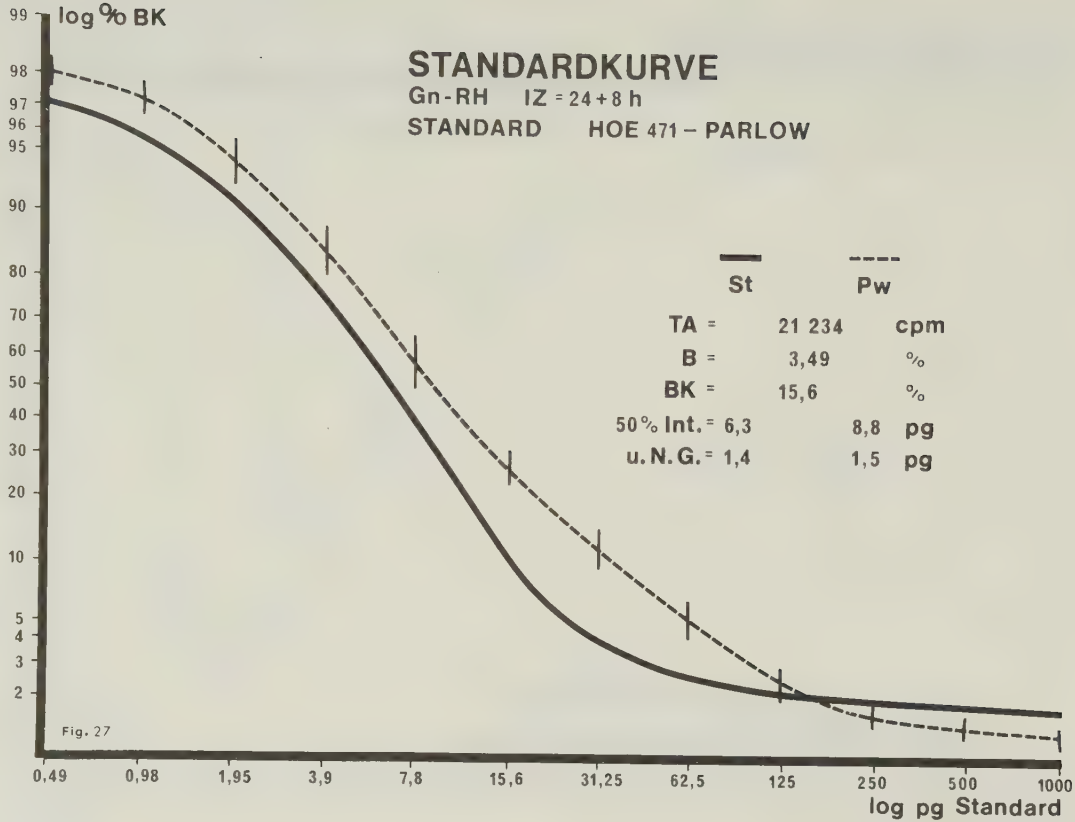

log % BK
STANDARDKURVE
Gn-RH IZ = 24 + 8 h
STANDARD HOE 471 – PARLOW
St
Pw
TA = 21 234 cpm
B = 3,49 %
BK = 15,6 %
50 % Int. = 6,3 8,8 pg
u. N. G. = 1,4 1,5 pg
99
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
4
3
2
0,49
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
62,5
125
250
500
1000
log pg Standard

Fig. 27

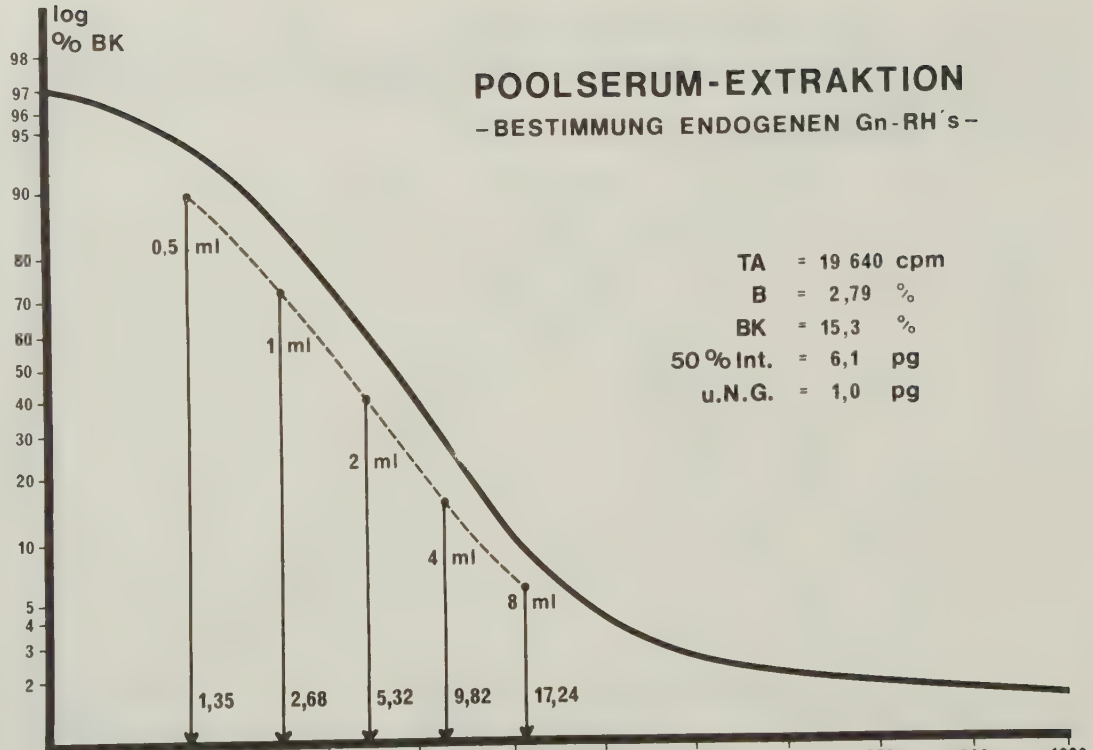
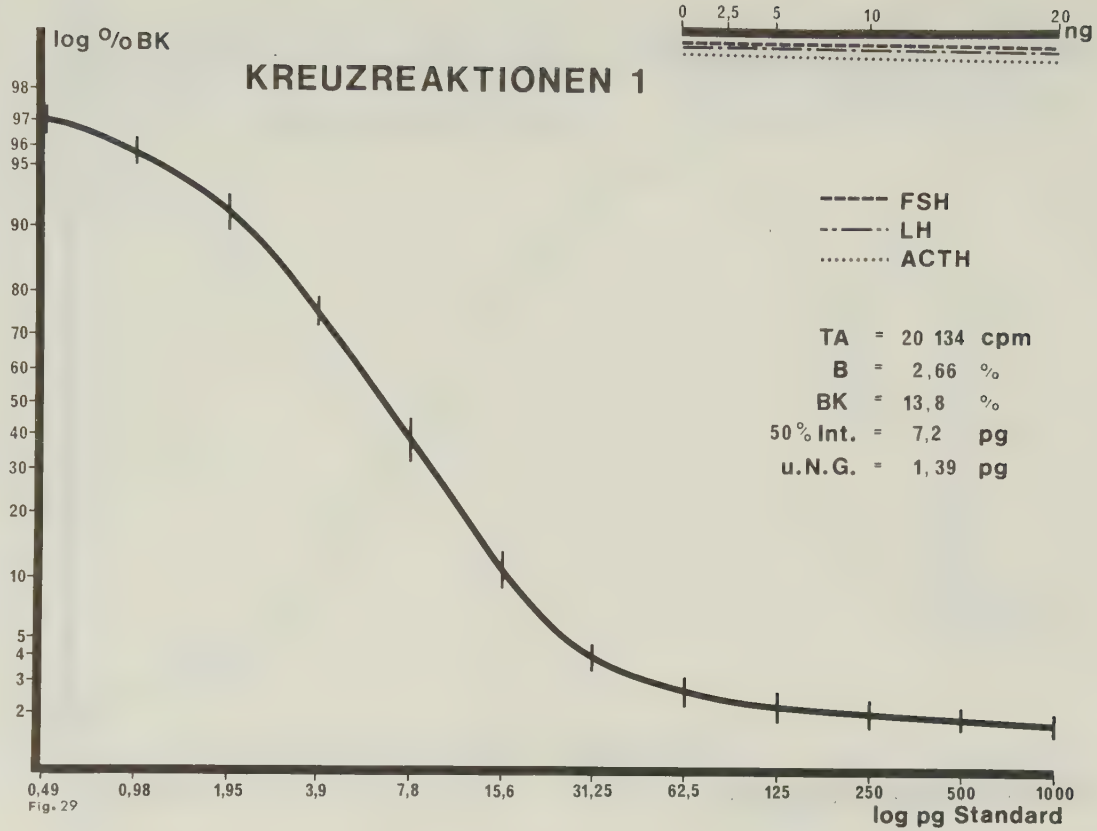


Fig. 28 Extraktion und Bestimmung verschiedener Serummengen
(Parallelität zur Standardkurve)


KREUZREAKTIONEN 1
log %BK
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
4
3
2
0 2,5 5 10 20 ng
FSH
LH
ACTH
TA = 20 134 cpm
B = 2,66 %
BK = 13,8 %
50% Int. = 7,2 pg
u.N.G. = 1,39 pg
0,49 0,98 1,95 3,9 7,8 15,6 31,25 62,5 125 250 500 1000
log pg Standard
Fig. 29

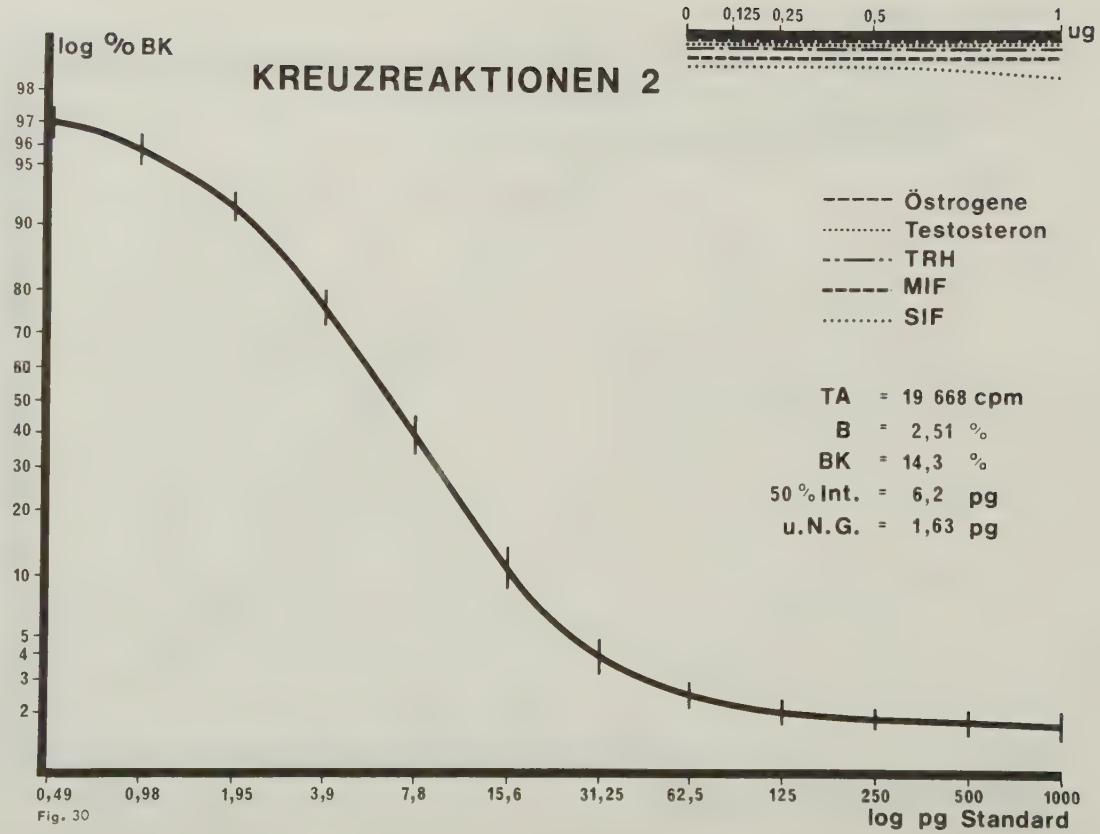
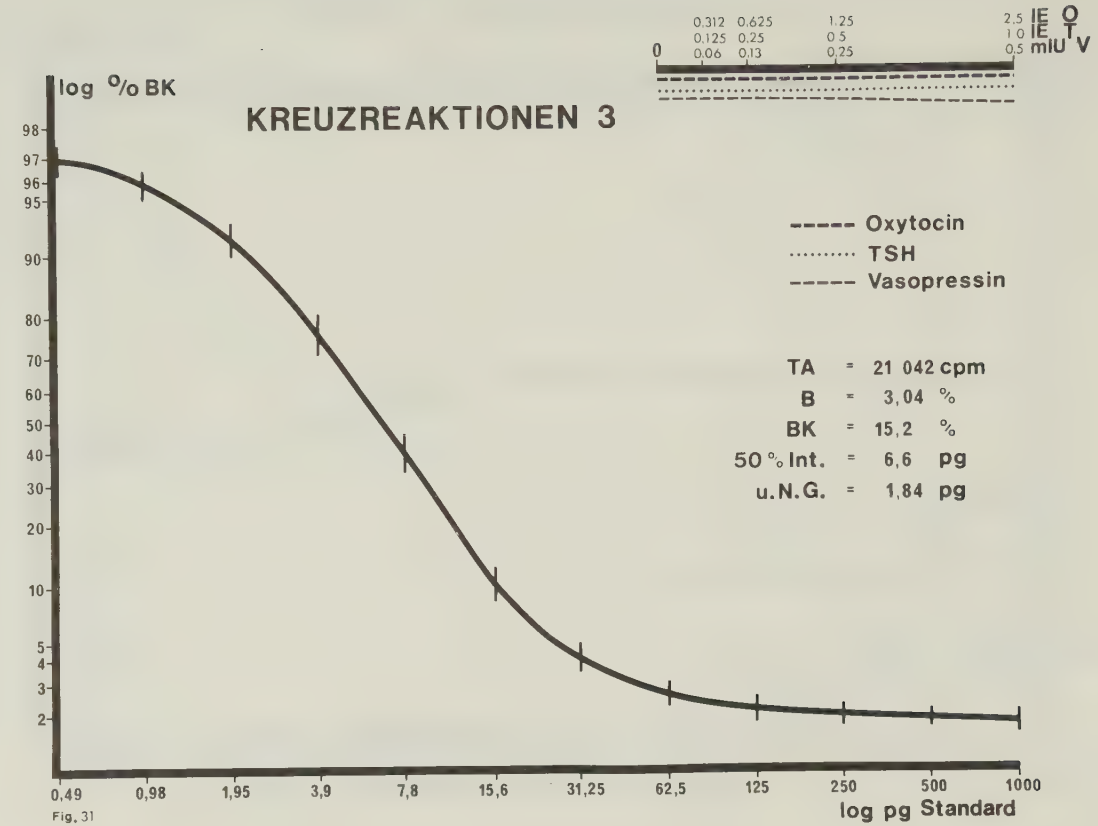

KREUZREAKTIONEN 2
log % BK
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
4
3
2
0 0,125 0,25 0,5 1 ug
Östrogene
Testosteron
TRH
MIF
SIF
TA = 19 668 cpm
B = 2,51 %
BK = 14,3 %
50 % Int. = 6,2 pg
u.N.G. = 1,63 pg
0,49 0,98 1,95 3,9 7,8 15,6 31,25 62,5 125 250 500 1000
log pg Standard

Fig. 30


KREUZREAKTIONEN 3
log % BK
98
97
96
95
90
80
70
60
50
40
30
20
10
5
4
3
2
0,49
0,98
1,95
3,9
7,8
15,6
31,25
62,5
125
250
500
1000
log pg Standard
0
0.312 0.625
0.125 0.25
0.06 0.13
1.25
0.5
0.25
2.5 IE O
1.0 IE T
0.5 mIU V
----- Oxytocin
..... TSH
----- Vasopressin
TA = 21 042 cpm
B = 3,04 %
BK = 15,2 %
50 % Int. = 6,6 pg
u.N.G. = 1,84 pg
Fig. 31

HALTBARKEIT VON Gn-RH IM VOLLBLUT

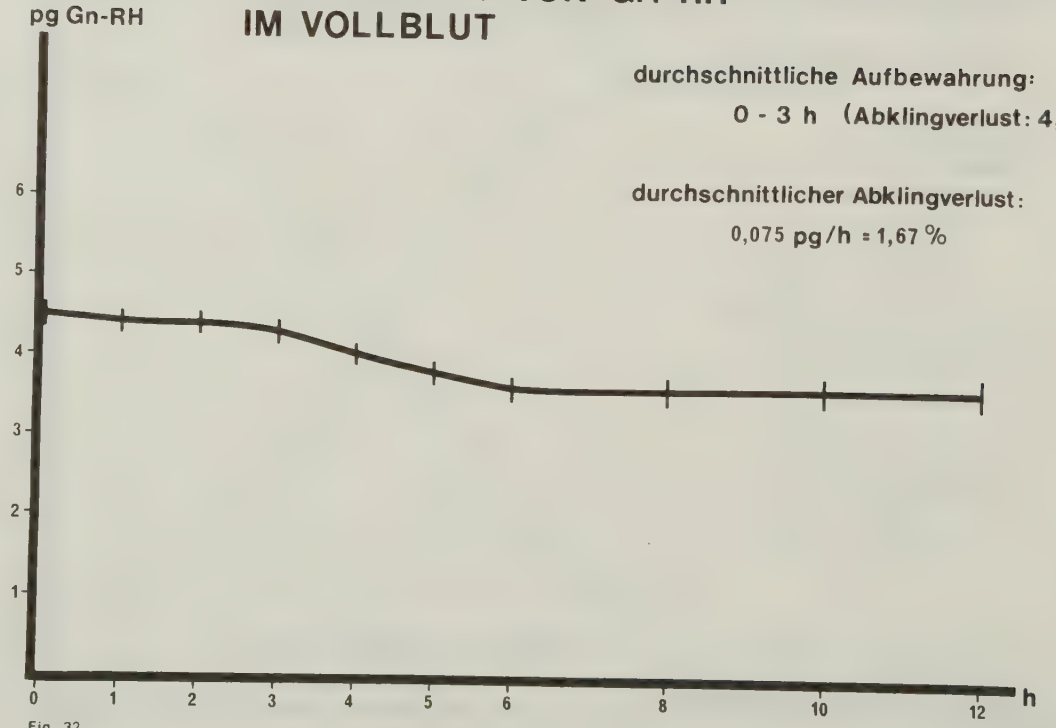


Fig. 32

Gn-RH – HALBWERTSZEIT

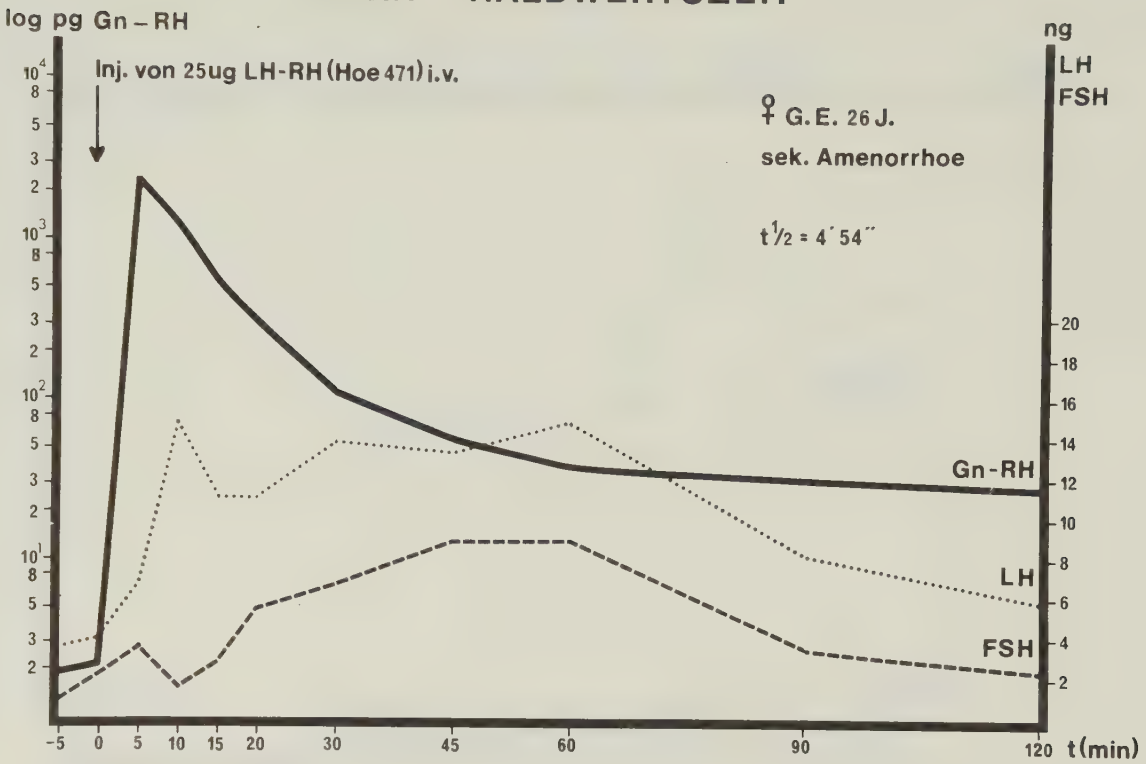


Fig. 33 LH-RH – Test Bestimmung der Gn-RH – Halbwertszeit

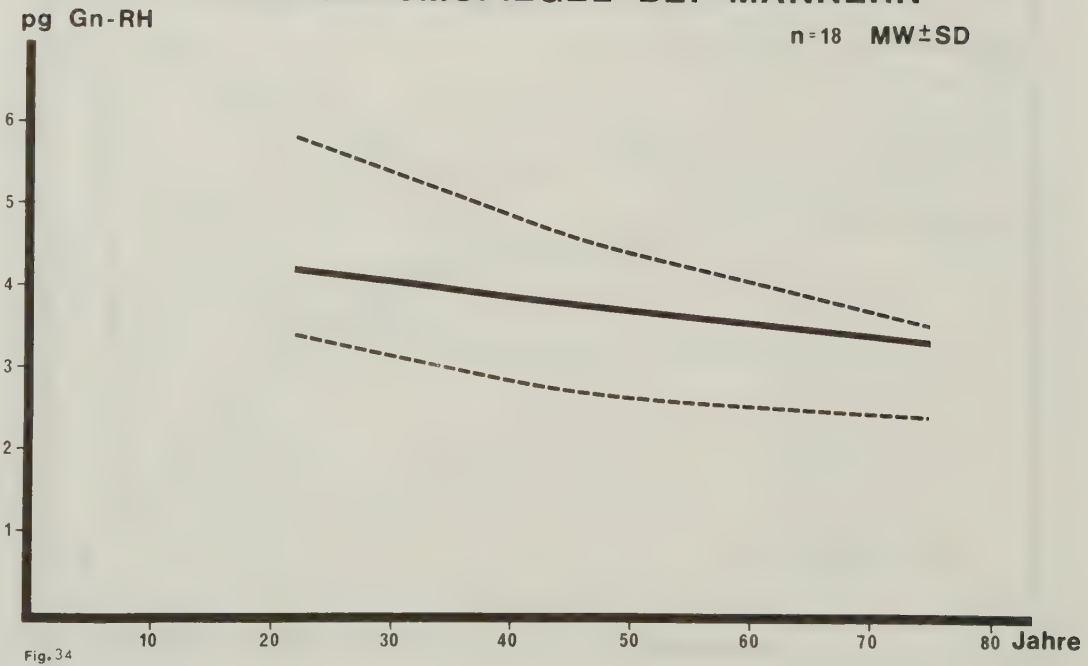

SERUMSPIEGEL BEI MÄNNERN
pg Gn-RH
n=18 MW±SD
6
5
4
3
2
1
10
20
30
40
50
60
70
80 Jahre

Fig. 34

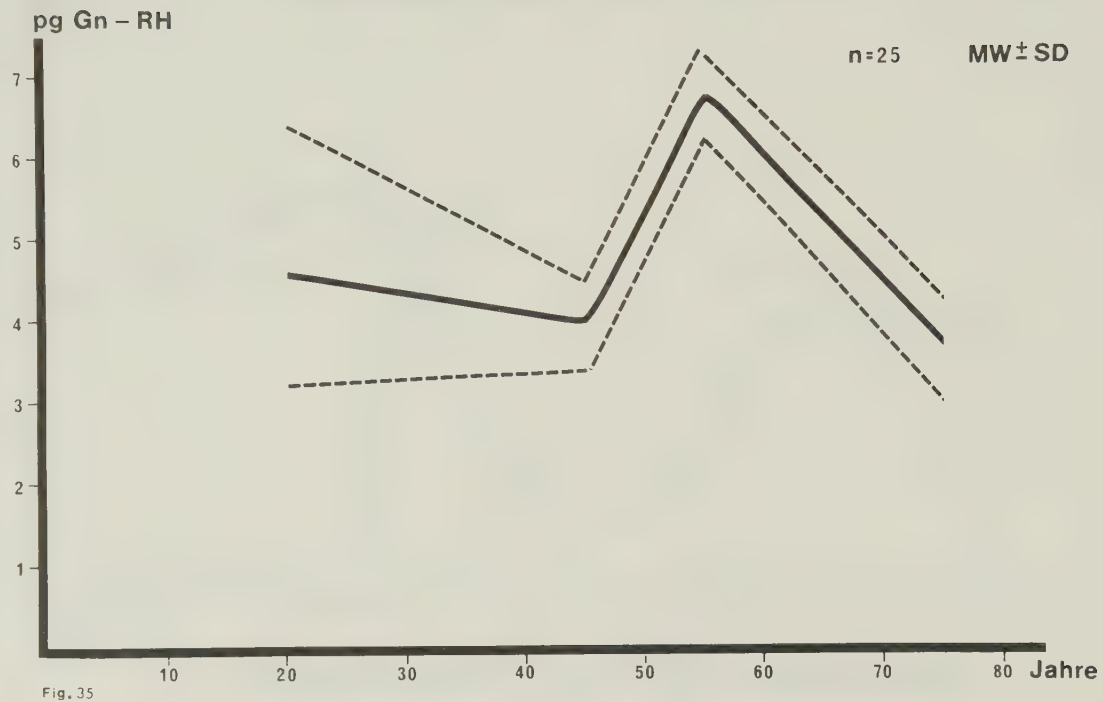

SERUMSPIEGEL BEI FRAUEN
pg Gn – RH
n=25
MW ± SD
7
6
5
4
3
2
1
10
20
30
40
50
60
70
80
Jahre

Fig. 35

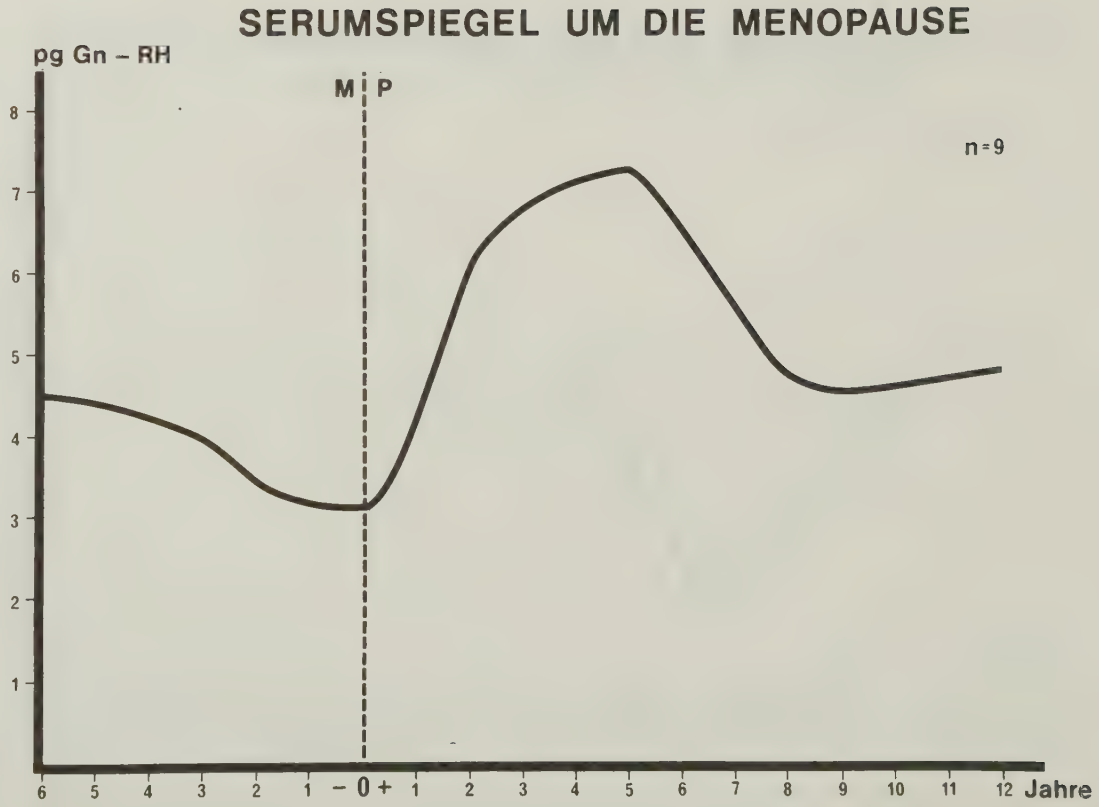

SERUMSPIEGEL UM DIE MENOPAUSE
pg Gn – RH
M
P
n=9
8
7
6
5
4
3
2
1
6 5 4 3 2 1 – 0 + 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 Jahre

Fig. 36

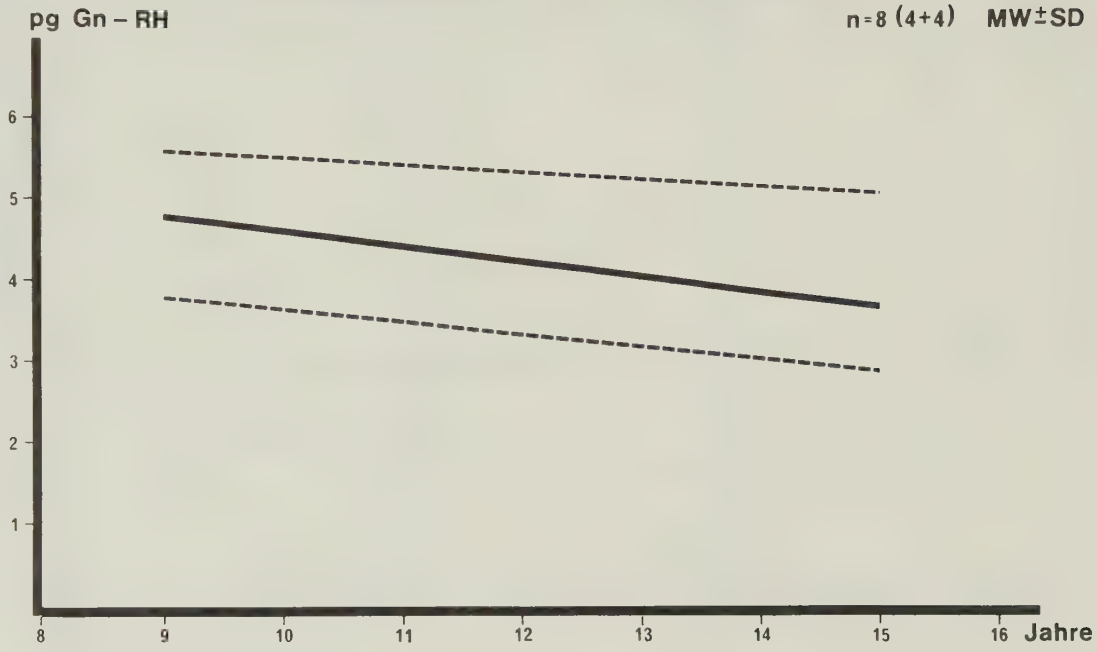

SERUMSPIEGEL BEI KINDERN ♂
pg Gn – RH
n=8 (4+4) MW±SD
6
5
4
3
2
1
8
9
10
11
12
13
14
15
16
Jahre

Fig. 37

SERUMSPIEGEL BEI KINDERN ♀

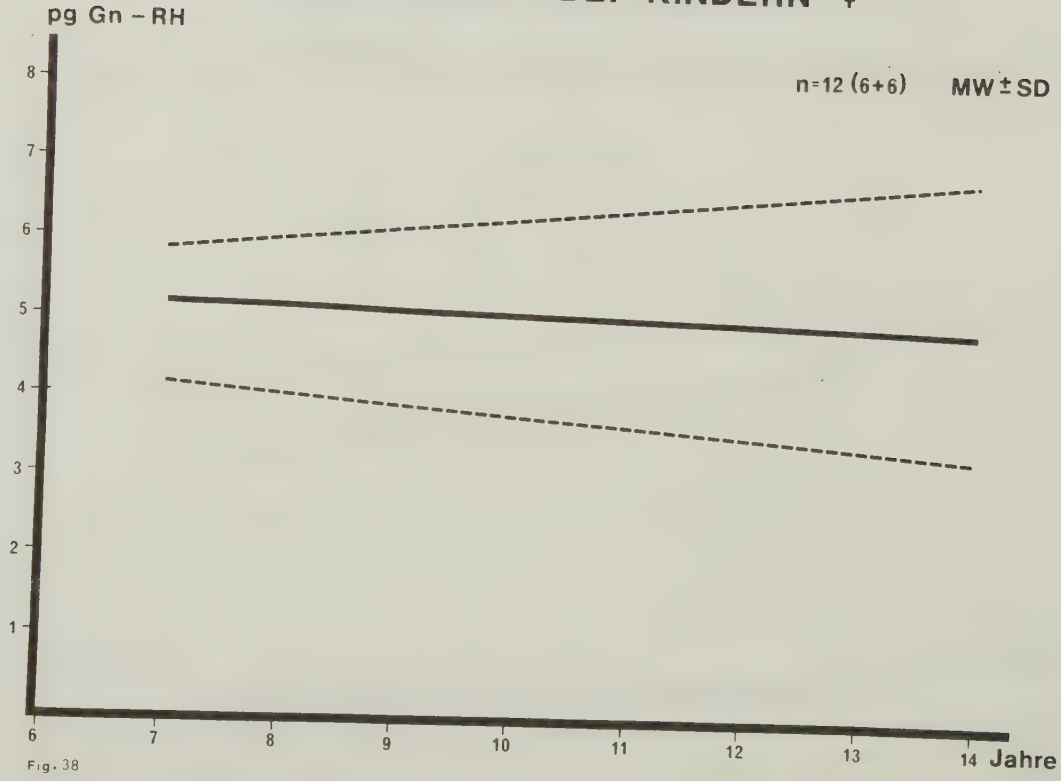


Fig. 38

Gn-RH IM ZYKLUS 1

S. S. 23 J.

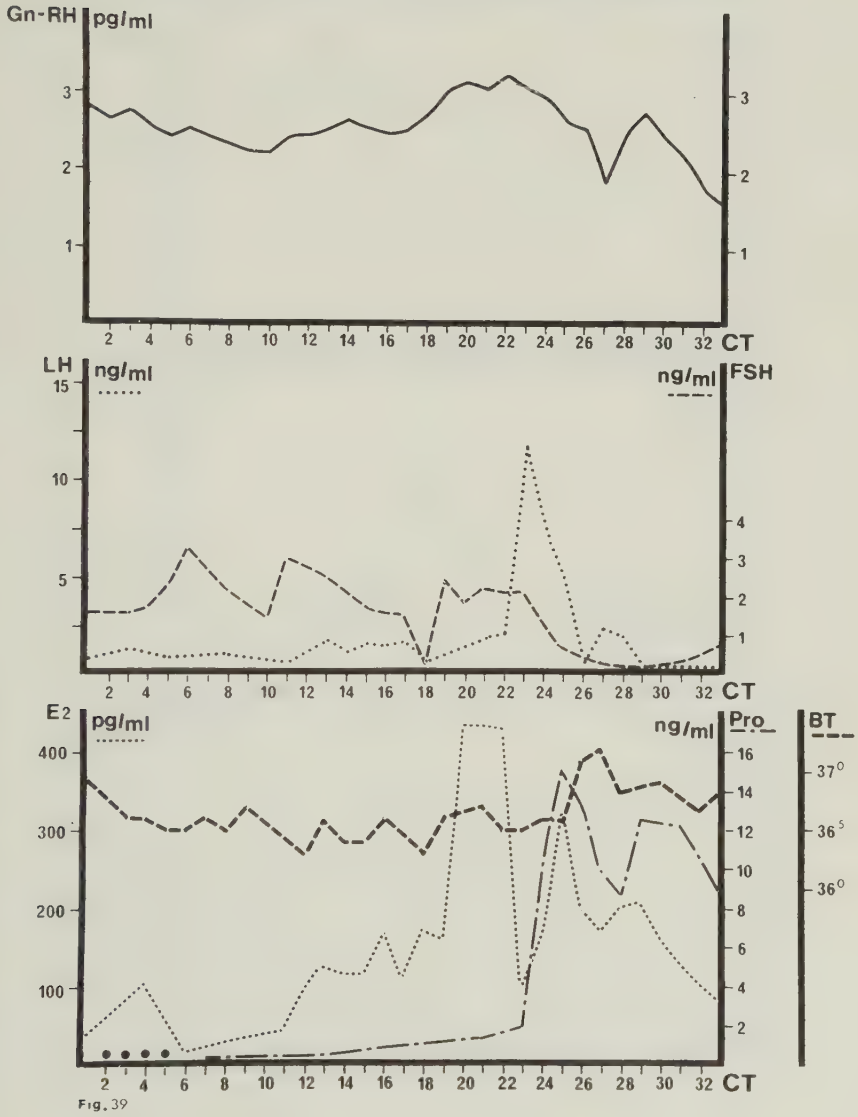


Fig. 39

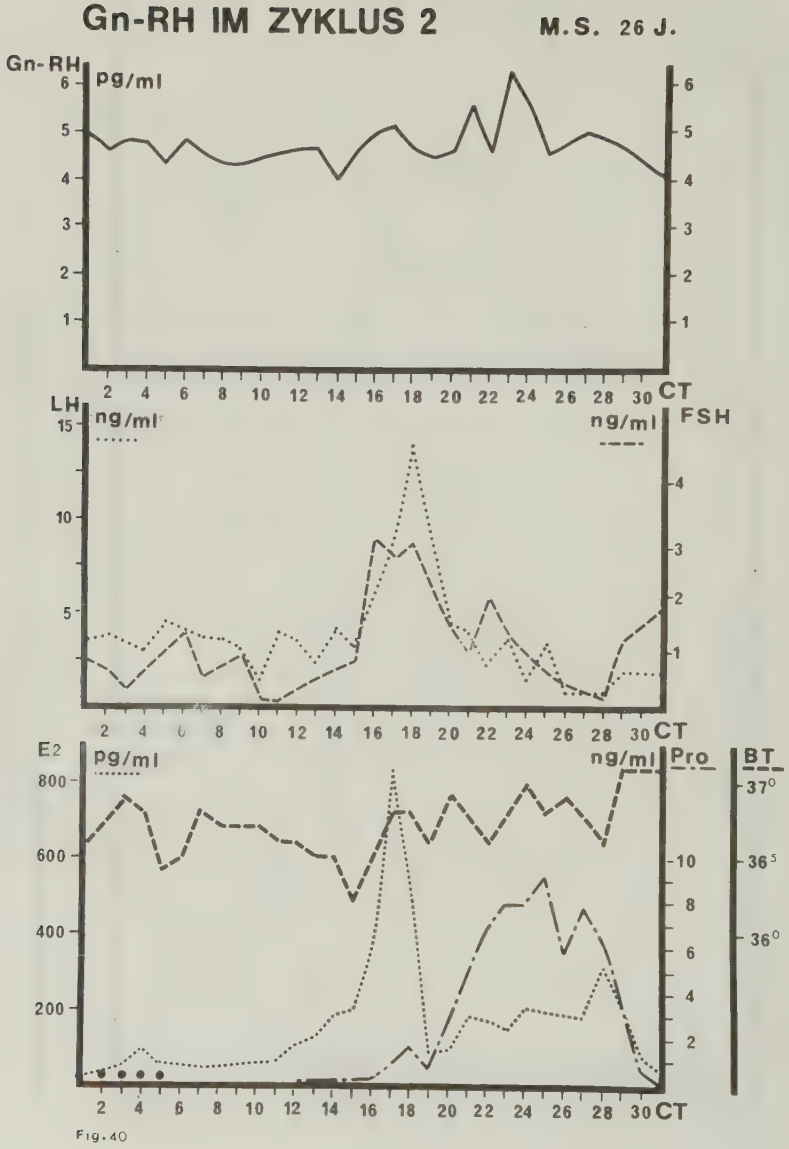

Gn-RH IM ZYKLUS 2
M.S. 26 J.
Gn-RH
pg/ml
6
5
4
3
2
1
2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 CT
LH
ng/ml
15
10
5
FSH
ng/ml
4
3
2
1
E2
pg/ml
800
600
400
200
Pro
ng/ml
10
8
6
4
2
BT
37°
36,5
36°

Fig. 40

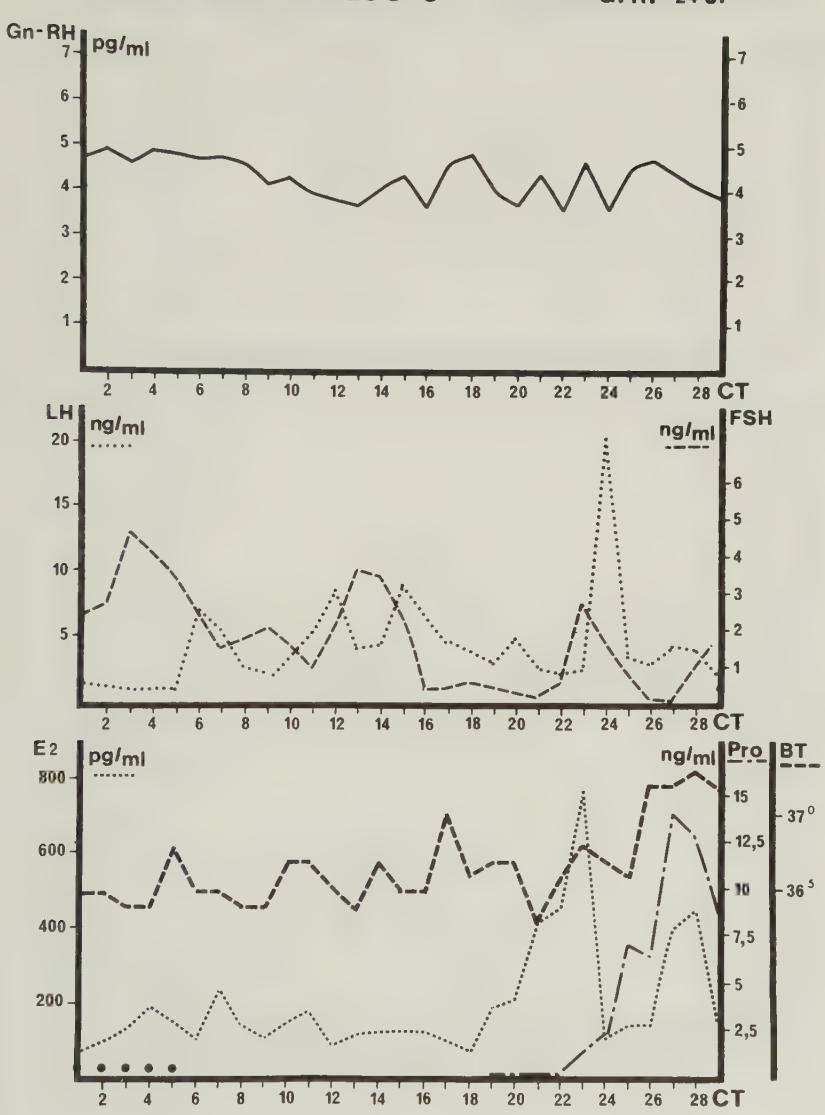

Gn-RH IM ZYKLUS 3
G. R. 24 J.
Gn-RH
pg/ml
LH
ng/ml
FSH
ng/ml
E2
pg/ml
Pro
ng/ml
BT
CT
37°
36,5

Fig. 41

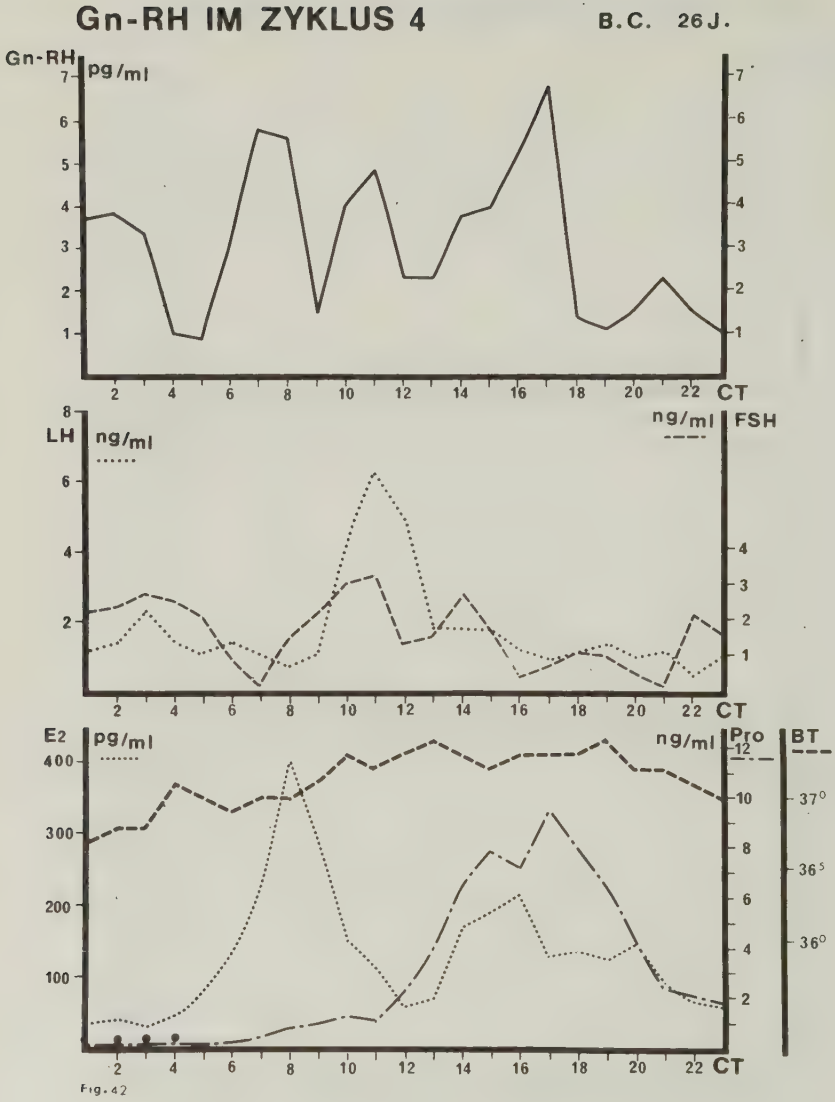

Gn-RH IM ZYKLUS 4
B.C. 26J.
Gn-RH
pg/ml
LH
ng/ml
FSH
ng/ml
E2
pg/ml
Pro
ng/ml
BT
CT

Fig. 42

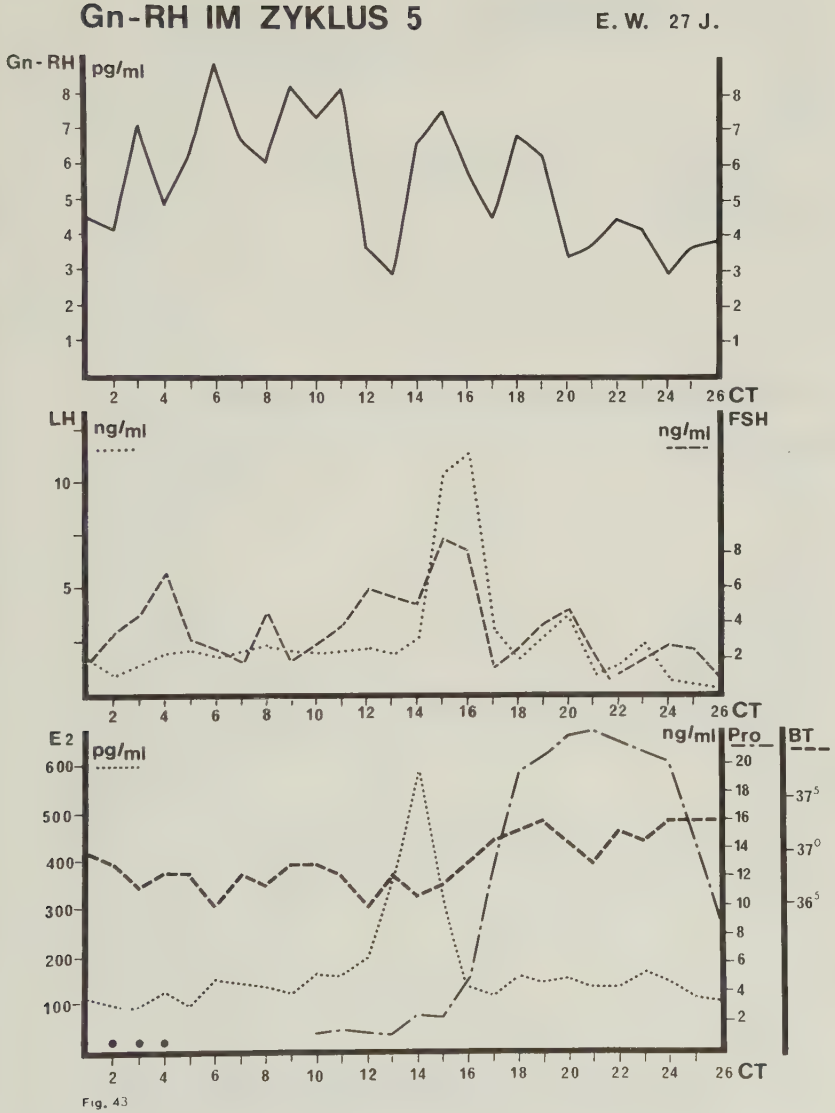

Gn-RH IM ZYKLUS 5
E. W. 27 J.
Gn-RH
pg/ml
LH
ng/ml
FSH
ng/ml
E2
pg/ml
ng/ml
Pro
BT
CT

Fig. 43

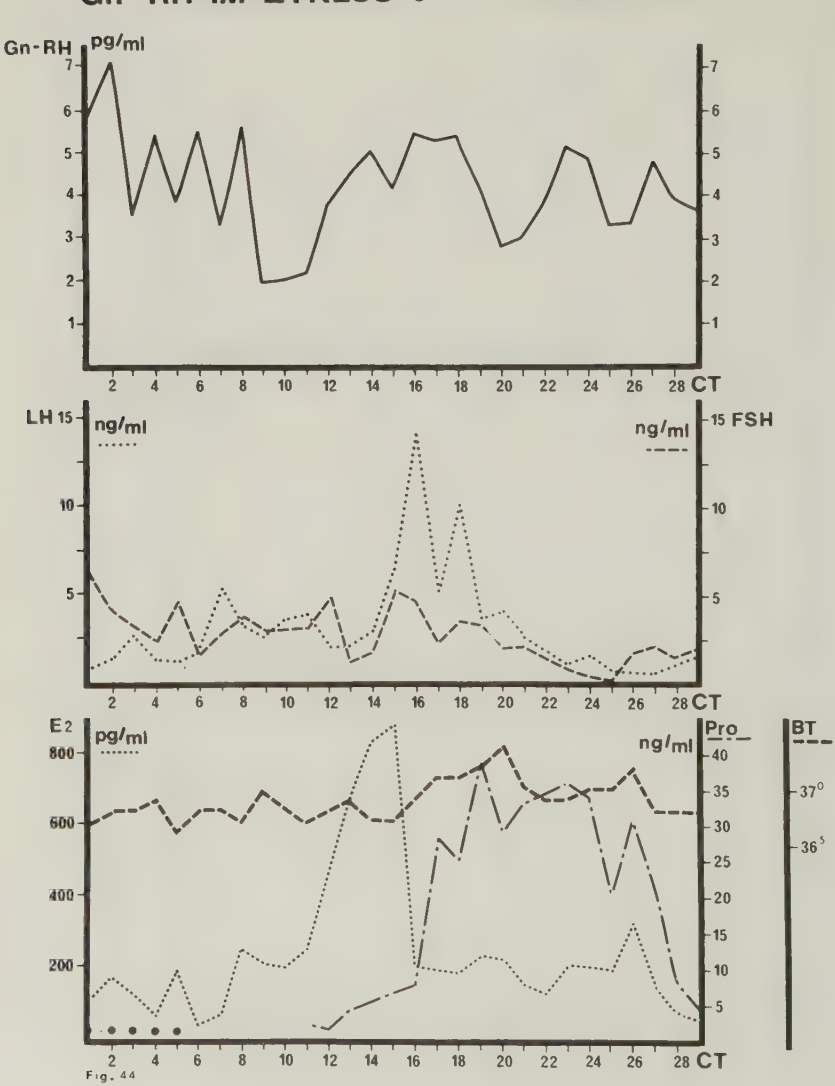

Gn-RH IM ZYKLUS 6
E.K. 30 J.
Gn-RH pg/ml
LH ng/ml
FSH ng/ml
E2 pg/ml
Pro ng/ml
BT
37°
36,5
CT

Fig. 44

HORMONELLER ZYKLUSVERLAUF

(in Bezug zum LH-Peak)

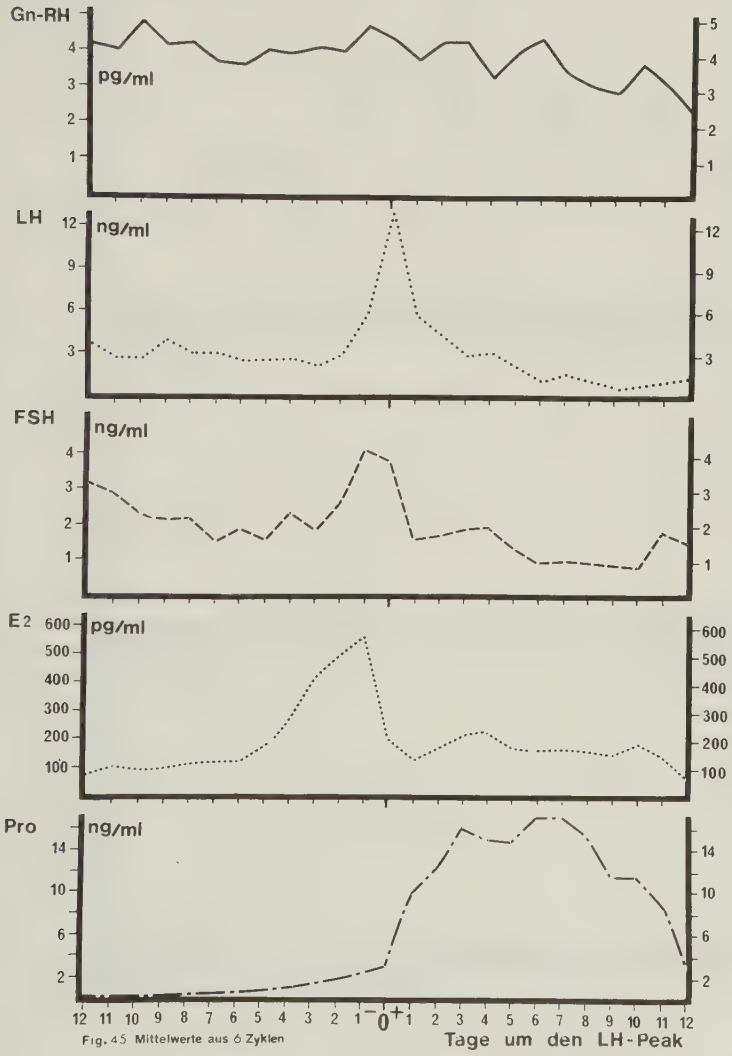


Fig. 45 Mittelwerte aus 6 Zyklen

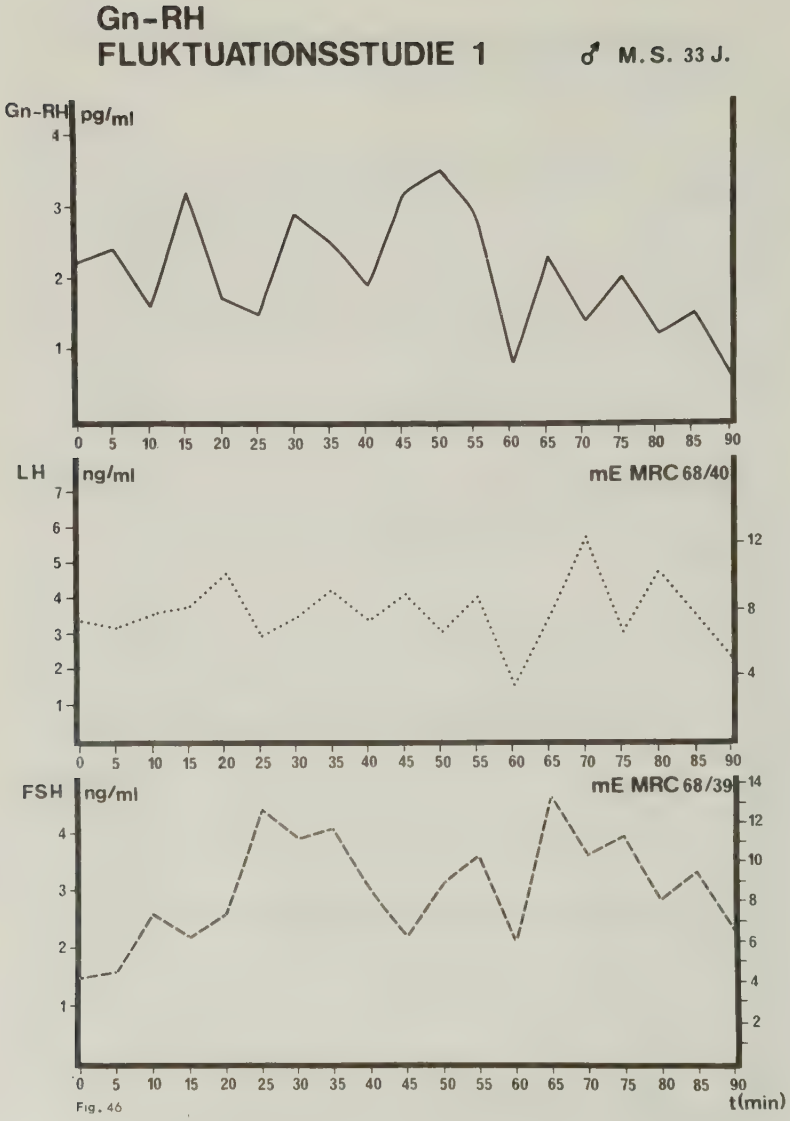

Gn-RH
FLUKTUATIONSSTUDIE 1
♂ M.S. 33 J.
Gn-RH pg/ml
LH ng/ml
mE MRC 68/40
FSH ng/ml
mE MRC 68/39
t(min)

Fig. 46

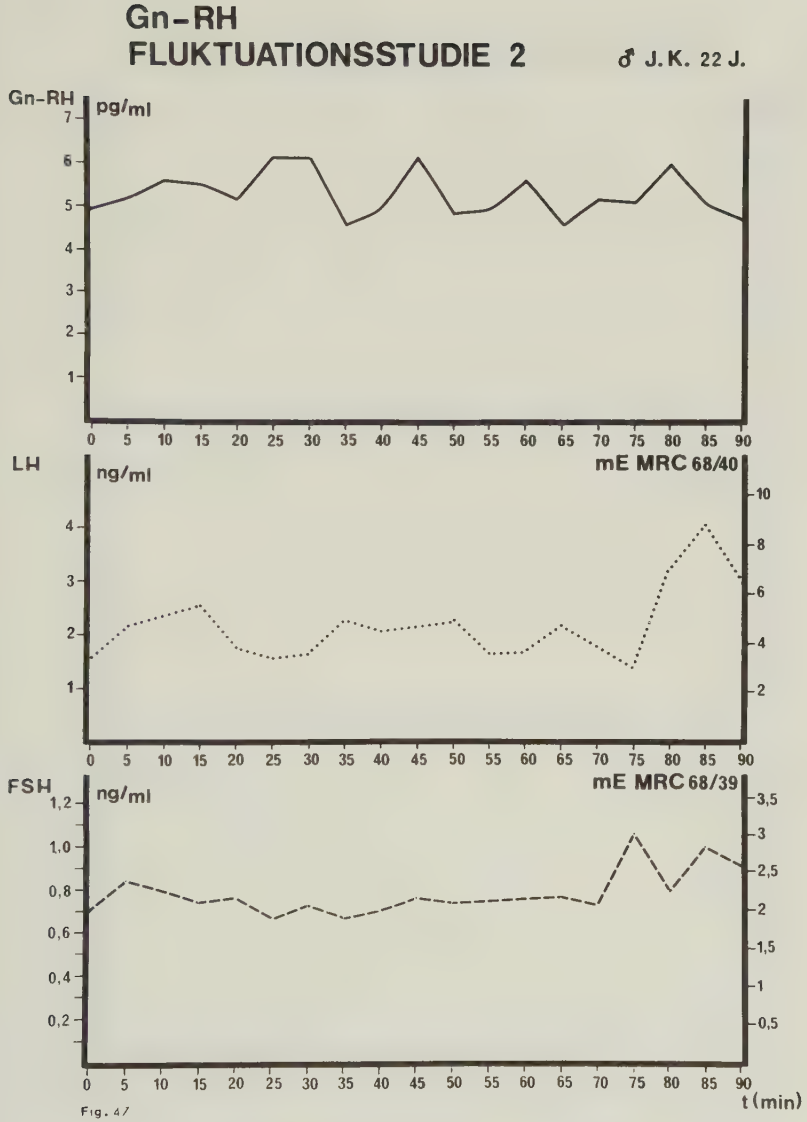

Gn-RH
FLUKTUATIONSSTUDIE 2
♂ J.K. 22 J.
Gn-RH
pg/ml
LH
ng/ml
mE MRC 68/40
FSH
ng/ml
mE MRC 68/39
t (min)

Fig. 47

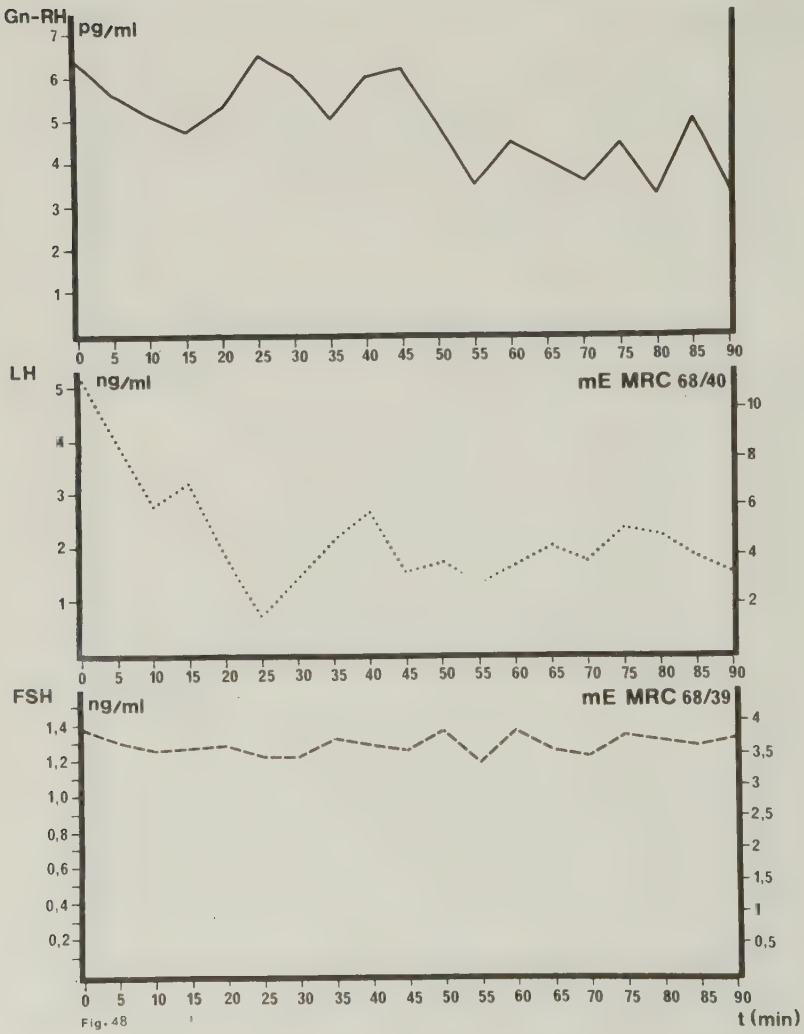

Gn-RH
FLUKTUATIONSSTUDIE 3
♂ F. D. 27 J.
Gn-RH
pg/ml
LH
ng/ml
mE MRC 68/40
FSH
ng/ml
mE MRC 68/39
t (min)

Fig. 48

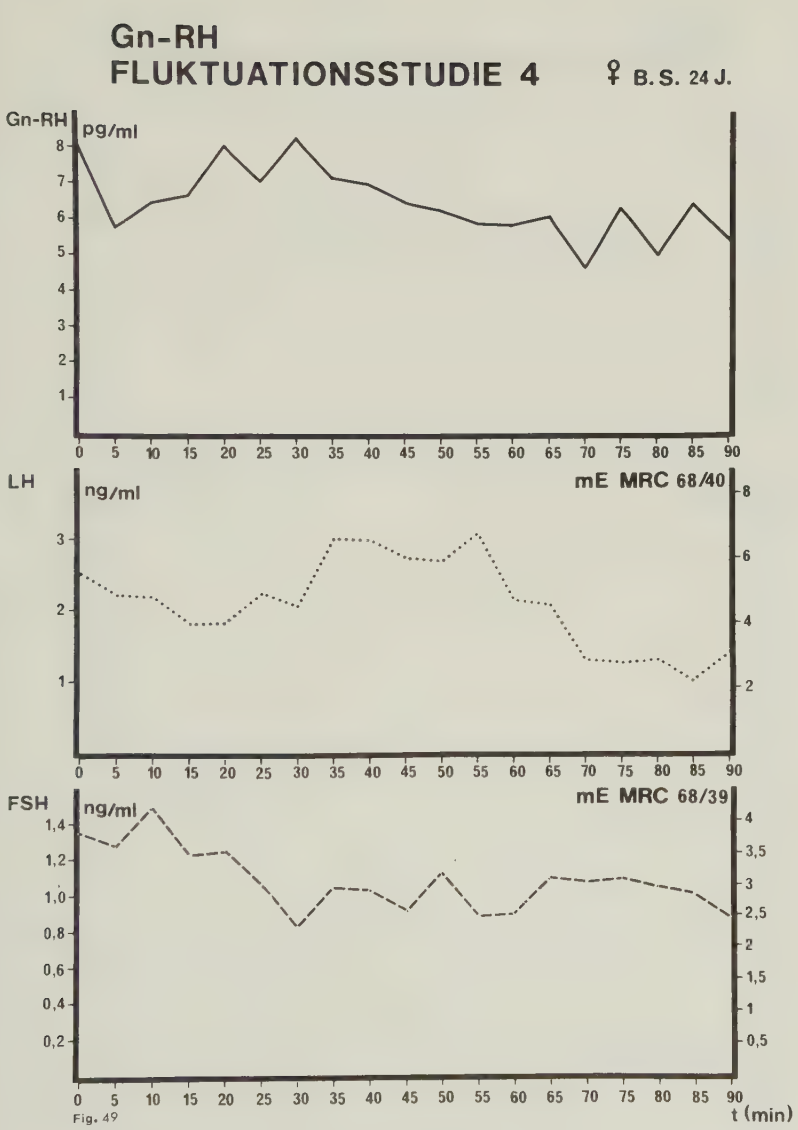

Gn-RH
FLUKTUATIONSSTUDIE 4
♀ B.S. 24 J.
Gn-RH
pg/ml
LH
ng/ml
mE MRC 68/40
FSH
ng/ml
mE MRC 68/39
t (min)

Fig. 49

Gn-RH
FLUKTUATIONSSTUDIE 5 ♀ M.E. 32 J.

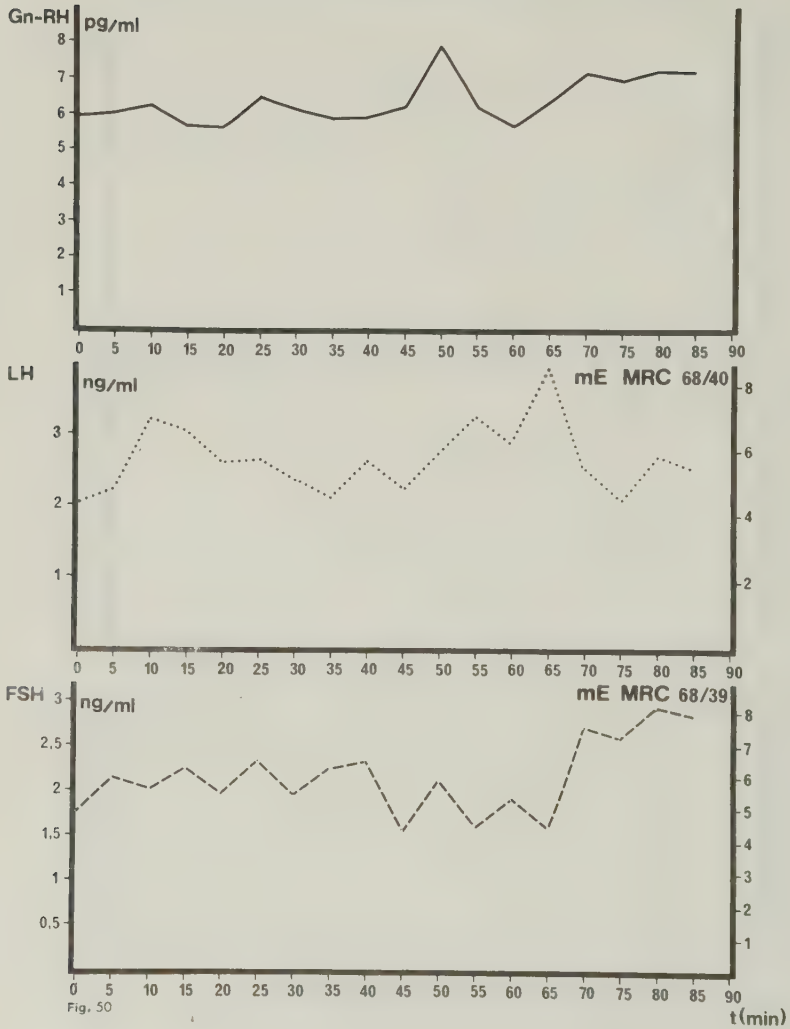


Fig. 50

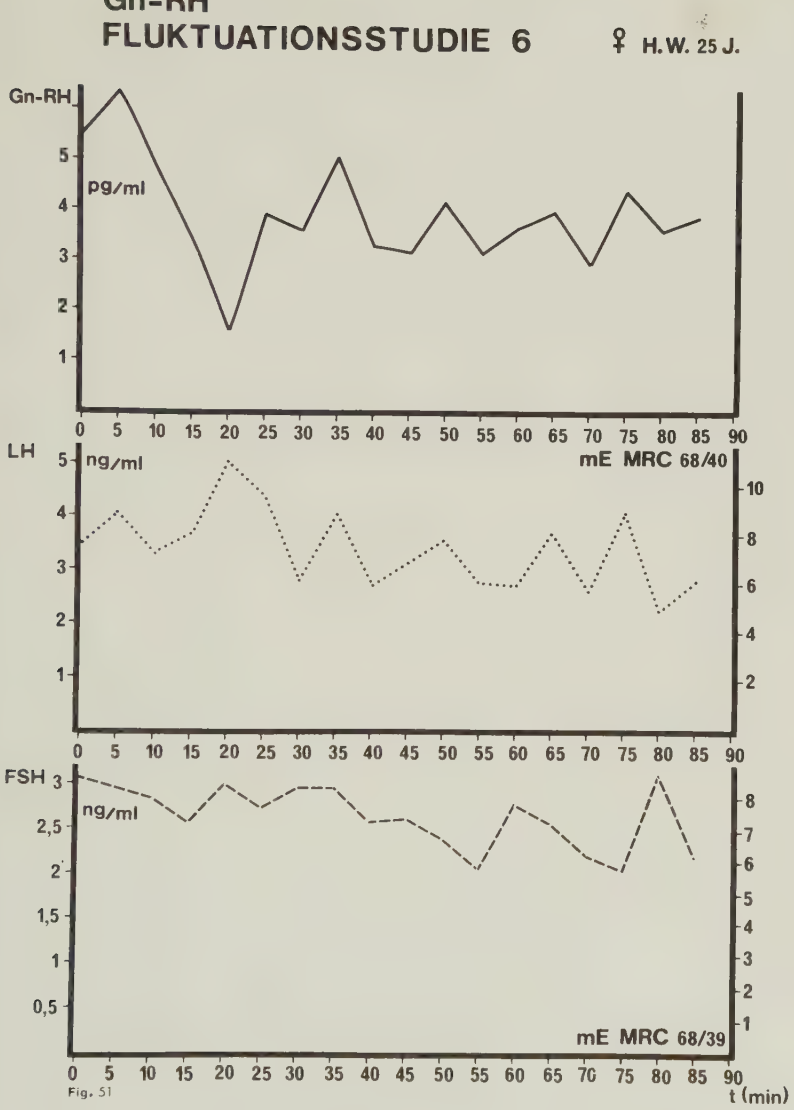

Gn-RH
FLUKTUATIONSSTUDIE 6
♀ H.W. 25 J.
Gn-RH
pg/ml
LH
ng/ml
mE MRC 68/40
FSH
ng/ml
mE MRC 68/39
t (min)

Fig. 51

SCHNELL
DRUCK
STEGLITZ
BERLINICKESTRASSE 14-15
1000 BERLIN 41
791 80 80